Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung
Abteilung für physikalische Biologie
Direktor: Professor Dr. H. Friedrich-Freksa

CYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN HAMSTEREMBRYOZELLEN NACH TRANSFORMATION ZU PERMANENTEM WACHSTUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
vorgelegt von

Reinhard Horowski
aus Zittau

1970

Aus dem Max-Planck-Institut für Virusforschung
Abteilung für physikalische Biologie
Direktor: Professor Dr. H. Friedrich-Freksa

CYTOGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN HAMSTEREMBRYOZELLEN NACH TRANSFORMATION ZU PERMANENTEM WACHSTUM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen
vorgelegt von

Reinhard Horowski
aus Zittau

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Peiffer
1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Friedrich-Freksa
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Haberlandt
(Professor Dr. Dr. H. Ritter)

Herrn Professor Dr. Hans Friedrich-Freksa will ich an dieser Stelle meinen tiefen Dank für zahlreiche und ausführliche Diskussionen und Anregungen zu dieser Arbeit aussprechen. Ihm und allen seinen Mitarbeitern danke ich für alles, was ich im Max-Planck-Institut für Virusforschung gelernt habe.
Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Dr. K.-U. Hartmann für die Aufnahme in sein Labor.

Je me permets d'y exprimer ma reconnaissance profonde à Jean Bernard, Professeur en chaire à la faculté de Médecine de Paris, qui m'a reçu dans son Service, et au Professeur agregé, Joseph Tanzer, qui m'a introduit dans la Cytogénétique.

I N H A L T

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	7
ERGEBNISSE	14
DISKUSSION	30
STATISTIK	44
ZUSAMMENFASSUNG	50
LITERATUR	52
ABBILDUNGEN UND TAFELN	60
LEBENSLAUF	

Einleitung

Im Jahre 1914 veröffentlichte der Zoologe Theodor BOVERI in Jena seine Arbeit: "Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren." (1) In dieser Arbeit sieht er als Ursache für die Entstehung von Karzinomen ein gestörtes Gleichgewicht der genetischen Substanz der Zelle, die in den Chromosomen lokalisiert ist. Diese Störung des Gleichgewichtes entsteht nach seiner Meinung durch abnorme Mitosen, wie sie bereits KLEBS (1889) und HANSEMANN (1906) in Tumorgeweben beobachtet und beschrieben hatten. Die Chromosomentheorie der Krebsentstehung postuliert bei BOVERI die Vermehrung teilungsfördernder oder den Wegfall hemmender Chromosomen oder Chromosomenteile, d.h. eine Störung der Zellteilungsregulation.

Wegen technischer und methodischer Schwierigkeiten konnten zu dieser Theorie lange Zeit keine Untersuchungen durchgeführt werden. Erst die zufällige Entdeckung von HSU (1952) (24), daß in Zellen, die mit hypotonen Lösungen behandelt wurden, die Chromosomen gut ausgebreitet und damit zählbar und analysierbar waren, führte zur Entstehung der

modernen Zytogenetik. Darauf erst konnte die tatsächliche Chromosomenzahl der menschlichen Zelle (TJIO und LEVAN, 1956) (23) mit 46 erkannt werden.

Eine weitere zufällige Entdeckung von NOWELL (1960) (22), daß nämlich mit Phytohämagglutinin behandelte Lymphocyten zur Teilung stimuliert werden konnten, sowie die Verwendung von Colchicin zur Anreicherung von Metaphasen (LEVAN, 1954) (59) ermöglichten umfassende Chromosomenuntersuchungen. Dabei wurden Zahl und Form der normalen Chromosomen zahlreicher Tiere und Pflanzen gefunden sowie der Zusammenhang spezifischer Chromosomenveränderungen mit definierten Krankheitsbildern gezeigt, wie z.B. beim Mongolismus = Trisomie 21 (entdeckt von LEJEUNE, 1959) (26), dem Klinefeltersyndrom = XXY, dem Turnersyndrom = XO sowie der chronisch-myeloischen Leukämie = Philadelphia-Chromosom (entdeckt von NOWELL und HUNGERFORD, 1960) (68).

Diese letzte Entdeckung, nämlich das Auftreten einer spezifischen Chromosomenaberration (wahrscheinlich Deletion beider langen Arme eines Chromosoms 21 = Philadelphia-Chromosom in den

leukämischen Zellen des Knochenmarks und des Blutes) regte zahlreiche weitere Chromosomenuntersuchungen bei Leukämie und Tumoren an (46, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 61). Für die akuten Leukämien wurde immer gefunden:

(a) eine mehr oder weniger ausgeprägte Aneuploidie
(b) das Auftreten von Stammlinien, d.h. Bevorzugung einer bestimmten Chromosomenzahl
(c) Veränderungen im Lauf des Fortschreitens der Krankheit im Sinn klonaler Evolutionen
(d) eine gewisse Korrelation zwischen der Zunahme der Aneuploidie und der klinischen Malignität der Leukämie. (51, 52, 55)

Bei den soliden Tumoren ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse (48, 50, 53, 54, 57, 58, 60, 61), die mit technischen Schwierigkeiten zu begründen sind: Zum einen wegen der Notwendigkeit, die Tumoren vor der hypotonen Behandlung mit technischen Mitteln zu einer Einzelzellsuspension aufzulösen, bzw. die Anfertigung von Quetschpräparaten, was beides zu Artefakten und damit fälschlich zur Annahme einer Aneuploidie führen kann; zum anderen wegen des häufigen Vorkommens normaler Zellen (Lymphocyten, Fibroblasten) zwischen den Tumorzellen, was wiederum zur falschen Annahme

eines diploiden Karyotyps führen kann. Weiterhin ist es nicht möglich, bei Tumoren den Beginn der Malignität exakt zu datieren; damit läßt sich, wenn ein diploider Chromosomensatz gefunden wird, einwenden, daß sich der Tumor noch im benignen Stadium befand, während bei einem aneuploiden Chromosomenmodus immer noch angenommen werden kann, daß ein solcher Tumor schon fortgeschritten maligne und daher aneuploid gewesen sei.

Zur Zeit scheint für einige Primärtumoren auch bei kritischer Betrachtung der Methodik ein diploider Karyotyp nachgewiesen zu sein (46, 48, 53, 54). Ebenso jedoch sind pseudodiploide (48, 60) und aneuploide (32, 50, 57, 58, 61) Primärtumoren beschrieben.

Bei transplantierten Tumoren findet sich Aneuploidie (im allgemeinen hyperdiploid-hypotetraploid). Dabei werden die Variationen in Zahl und Form der Chromosomen bei raschem Wachstum oder häufigen Transplantationen größer, doch können daraus auch wieder durch Selektion Stammlinien entstehen.

Bei Tumorzellen in der Aszitesform bzw. in Gewebekulturen ist die Aneuploidie fast immer besonders ausgeprägt. Doch gibt es auch hier wieder Stammlinien,

die sich bei unterschiedlicher Behandlung der Zellkultur ändern können (Zusammenfassung 2, 49). Auch Normalzellen, die durch Viren, karzinogene Substanzen oder spontan transformiert wurden, weisen Aneuploidie auf, so daß diese als eines der allerdings nicht absolut sicheren Kriterien der Transformation gilt (SANFORD, 1965, 1968) (2, 4, 5). Dazu ist zu bemerken, daß der Begriff Transformation unterschiedlich definiert wird. Zum einen wird darunter jede irreversible Veränderung der Zellen verstanden (2); andere Autoren sprechen nur dann von Transformation einer Zellkultur, wenn mit diesen Zellen danach im Tierexperiment Tumoren (meist Fibro-Sarkome) erzeugt werden konnten. Die durch diese unterschiedlichen Vorstellungen in der Literatur entstandene Unklarheit kann jedoch beseitigt werden, wenn man wie wir der Meinung ist, daß Transformation zu permanentem Wachstum in vitro und Fähigkeit zur Tumorbildung in vivo in Zellkulturen zwei getrennte Ereignisse sind. Dafür sprechen auch die Experimente von O. JARRETT und J. MACPHERSON (70), die an der seit 1962 permanent wachsenden Zell-Linie BHK 21 (baby hamster kidney) tumorerzeugende Zellen von den keine Tumoren hervorrufenden Zellen unterscheiden und durch Klonierung auch trennen konnten.

Das Auftreten der Aneuploidie bei Tumorzellen könnte durch verschiedene Mechanismen verursacht werden: pathologische Mitosen, z.B. mit mehr als 2 Polen, Nichttrennung von Chromosomen oder Chromatiden, Verlust von Chromosomenmaterial in der Mitose und Bildung von Mikronuklei , Deletionen und Brüche von Chromosomen sowie Endoreduplikation. Unbeantwortet bleibt jedoch die Frage, ob diese Aberrationen Ursache (im Sinne der Theorie von BOVERI) oder Folge des ungehemmten und raschen Wachstums sind (42, 52).

Als Modell zu Untersuchungen darüber bietet sich die in vitro-Transformation normaler Zellen an. Aufgabe dieser Arbeit war es, im Zusammenhang mit dieser Fragestellung die in vitro-Transformation von Hamster-Embryozellen, welche spontan und nach Behandlung mit Benzpyren aufgetreten war, cytogenetisch zu verfolgen und durch Nachweis von Aneuploidie zu bestätigen. Hier waren auch die zeitlichen Beziehungen zwischen Transformation zu permanentem Wachstum und erstem Auftreten von Aneuploidie von Interesse. Die Zell-Linien wurden auf das Vorhandensein von Stammlinien und deren Veränderungen im Laufe der Zellkultur hin analysiert. Schließlich wurden Häufigkeit von Chromosomenaberrationen und Unterschiede zwischen einzelnen Zellstämmen untersucht.

Material und Methoden

1. Zellkultur:

16-18 Tage alte Embryonen von syrischen Goldhamstern (Mesocricetus auratus) aus eigener Zucht wurden unter sterilen Bedingungen gewonnen, mechanisch zerkleinert, dreimal gewaschen und trypsiniert (2,5 g Trypsin in 1 l Versenpuffer: 5 % di-Na-Versenat, EDTA 1 g, NaCl 40 g, KCl 1 g, $Na_2HPO_4x2H_2O$ 5,75 g, KH_2PO_4 0,1 g/Liter). Die Zellen wurden 20 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert, mit einem Magnetrührer leicht gerührt und durch Gaze gefiltert. Die so gewonnene Zellsuspension wurde in Eagle's Medium (30) mit 10 % Kalbserum in Gewebekulturflaschen (Rous-Flaschen, Fa. Schott, Mainz) zu 80 Milliliter je Portion ausgesät und im Brutschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre inkubiert. Der pH wurde durch Einleiten von Kohlendioxyd in den Brutschrank auf 7,2 eingestellt.

Diese Kulturen wurden, sobald eine Flasche mit einem Monolayer vollgewachsen war, mit Trypsin (5 min. bei 37°C) abgelöst und bei 300 g in einer MSE-Tisch-Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgesaugt und das Sediment in ungefähr 5 ml Eagle's Medium aufgenommen und durch wiederholtes

Aufziehen in einer Pasteurpipette resuspendiert. Je nach Zellzahl und Wachstum wurden dann aus einer Flasche zwei bis vier neue Flaschen mit Zellkulturen angelegt. Bei Bedarf wurden gleichzeitig jeweils 5 ml einer Suspension von ungefähr $1x10^6$ Zellen in Petri-Schälchen (Oberflächen-behandelt, Fa. Greiner, Nürtingen) zu Chromosomenuntersuchungen angesetzt.

Die in den Versuchen verwendeten Hamsterembryozell-kulturen wurden mir von H. und E. FRIEDRICH-FREKSA überlassen, denen ich auch die Angaben über das Wachstum und Verhalten der Stämme verdanke. Hierfür möchte ich ihnen auch an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen.

2. Medium:

EAGLE's Medium:

NaCl	6800.0 mg/l	L-Tyrosin	18.0 mg/l
KCl	400.0 "	L-Histidin	8.0 "
$Na_2HPO_4xH_2O$	140.0 "	L-Leucin	26.0 "
$MgSO_4x7H_2O$	200.0 "	L-Isoleucin	26.0 "
$CaCl_2$anhydr.	200.0 "	L- Lysin	26.0 "
Glucose	1000.0 "	L-Methionin	7.5 "
L-Arginin-HCl	21.0 "	L-Phenylalanin	16.5 "
L-Cystin	12.0 "	L-Threonin	24.0 "

L-Tryptophan	4.0 mg/l	D-Ca-pantothenat	1.0 mg/l
L-Valin	23.5 "	Pyridoxal-HCl	1.0 "
L-Glutamin	292.0 "	Thiamin-HCl	1.0 "
Biotin	1.0 "	Riboflavin	0.1 "
Folsäure	1.0 "	Inositol	1.8 "
Cholin-Cl	1.0 "	Phenolrot	10.0 "
Nicotinamid	1.0 "		

(Literatur: H. EAGLE, Science 122, 501-504, 1955, modifiziert nach den NIH-Richtlinien).

Diese Lösung wurde, wenn nicht anders angegeben, mit 5 % Kalbserum versetzt. Das o.a. Medium wurde vom Hersteller: Fa. GIBCO (Grand Island Biological Company, Grand Island, New York), bezogen.

Zusatz zu 10 l Medium:

Streptomycin	100 mg/l	
Penicillin	75 mg/l	
Eisenlösung	1 ml/l	(Stammlösung: 25 mg $Fe(NO_3)_2$ in 250 ml bidest. Wasser)
n-Butyl	1 ml/l	(Stammlösung: 0.1 g N-Butyl-p-hydroxybenzoat (MERCK) in 2.5 ml absolutem Äthanol (p.a. MERCK) gelöst und mit bidest. Wasser auf 500 ml aufgefüllt)
$NaHCO_3$	3.7 g/l	

Das Medium wurde mit Kohlendioxyd bis zur Orangefärbung durchströmt und dann durch Filtrieren mit Seitz-Filter EKS 14 (Fa. Seitz, Bad Kreuznach) steril gemacht und im Kühlraum bei $4^{o}C$ gelagert.

3. Chromosomen:

Zur Darstellung der Chromosomen wurde eine Abwandlung der Methode von ROTHFELS (1958 - Stain Technology, 33, 73) nach MOOREHEAD (1960 - Exp. Cell Res., 20, 613) (62) verwendet, die den Erfordernissen der in vitro-Kultur angepaßt wurde.

Die zu untersuchenden Zellstämme wurden in einer Dichte von 1×10^{6} Zellen/ml in 5 ml-Portionen in Petri-Schälchen (Fa. Greiner, Oberflächen-behandelt) in Eagle's Medium (10 % Kalbserum) ausgesät. Optimale Mitosewerte ergaben sich nach 6 bis 24 Stunden. Auf die Anwendung von Colchicin bzw. Colcemid konnte bei den sehr rasch wachsenden transformierten Stämmen verzichtet werden, da auch ohne diese Mittel stets reichlich Metaphasen gefunden wurden. Zudem wirkt Colchicin bzw. Colcemid auf Hamsterzellen nur schwach (100-fache Dosierung der für humane Leukozyten benötigten Menge) und ist dann oft schon cytotoxisch (37); es hätte deswegen vor jeder Chromosomenuntersuchung für den betreffenden Stamm ausgetestet werden müssen. Dagegen

war zur Untersuchung nicht transformierter Hamsterembryozellen Colchicin nötig (Fa. Ciba, Colchicin, Dosierung 20 µg/ml nach MOOREHEAD, P.S. und NOWELL, P.C. (in Methods in Medical Research, Vol. 10, Editor in Chief H.N. EISEN, Year Book Medical Publisher Inc., Chicago, 1964), Einwirkungsdauer 1 - 3 Stunden. Die Zellen wurden dann vorsichtig mechanisch abgelöst und in Zentrifugengläschen mit spitz zulaufendem Boden in einer MSE-Tisch-Zentrifuge bei 300 g 3 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen und die Zellen zur hypotonen Behandlung in 0,2 ml Medium mit 1 - 2 ml bidestilliertem Wasser übergossen und durch vorsichtiges Aufwirbeln mit einer Pasteurpipette resuspendiert. In der hypotonen Lösung standen die Zellen dann 30 Minuten bei Zimmertemperatur bzw. 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C. Am Mikroskop konnte geprüft werden, ob die Hypotonie ausreichend gewesen war: dies war der Fall, wenn nur noch Zellkerne sichtbar waren. Die Suspension wurde dann erneut zentrifugiert wie zuvor. Die überstehende Flüssigkeit wurde abgegossen und der Rest der Flüssigkeit über dem Sediment sehr sorgfältig abgesaugt, da selbst geringe Reste von Wasser die Fixierung und Färbbarkeit der Chromosomen unmöglich machten. Auf das Zellsediment wurde 2 ml frisch angesetzte Fixierlösung (Eisessig - Methanol 1:3,

beides p.a. (Fa. Merck) getropft und die Zellen im Sediment 30 Minuten lang fixiert. Danach wurde die überstehende Fixierlösung abgegossen und je nach Größe des Sediments 0,5 - 2 ml neue Fixierlösung zugegeben und das Sediment durch Ansaugen mit einer Pasteurpipette resuspendiert. Diese Suspension wurde aus Pasteurpipetten aus ungefähr 10 cm Höhe auf eisgekühlte Objektträger (fettfrei und gereinigt) getropft. Die Tropfen breiteten sich gut aus und durch das rasch verdunstende Methanol wurden die Zellen gut ausgebreitet. Die Präparate wurden mit Glasschreiber beschriftet, nach mindestens 1/2 Stunde Trocknen an der Luft mit Giemsa (Fa. Merck) 1:10 in destilliertem Wasser, pH 6) 30 Minuten lang gefärbt und danach wieder getrocknet. Die Präparate wurden dann am Photomikroskop (Fa. Zeiss) bei Obj. 6,3 untersucht und geeignete Metaphasen mit Ölimmersion photographiert. Dabei wurden nur gut ausgebreitete Metaphasen, deren Chromosomen ungefähr in einem Kreis lagen, ausgewertet, um Artefakte durch zerrissene Mitosen zu vermeiden. Zudem wurden Mitosen unter einer gewissen Größe nicht photographiert, da hier nicht mehr mit Sicherheit gesagt werden konnte, daß es sich um

intakte Metaphasen handelt. Objektträger, auf welchen häufig zerrissene Mitosen zu erkennen waren, wurden ganz verworfen. Versuche, direkt an auf Deckgläschen wachsenden Kulturen die Chromosomen darzustellen und damit mit einer geringeren Zahl von Zellen und ohne Zentrifugieren auszukommen, scheiterten immer daran, daß die Zellen sich bei der hypotonen Behandlung vom Glas ablösten.

Auswertung: Die Auswertung erfolgte durch Photographie geeigneter Metaphasen am Photomikroskop. Als Film wurde KB 14 (Adox) verwendet. Der belichtete Film wurde mit Rodinal 1:70 bei 20°C 12 Minuten lang entwickelt und dann fixiert und getrocknet. Von dem Film wurden Abzüge 18 x 24 cm Papier (Brovira extra hart) gemacht und diese dann nach Zahl der Chromosomen und Aberrationen ausgewertet. Zur Untersuchung des Karyotyps wurden die einzelnen Chromosomen ausgeschnitten und nach J.M. LEHMAN, I. MACPHERSON und P.S. MOOREHEAD (Karyotype of the Syrian golden hamster - J.Nat. Cancer Inst., 31, 639-650, 1963) (16) geordnet.

Ergebnisse:

Alle von Hamsterembryonen gewonnenen Zellkulturen zeigten während der ersten Passagen ein gutes Wachstum. Der Morphologie nach war bei diesen Zellen der Fibroblastentyp vorherrschend; sie wuchsen als einzellige Schicht (monolayer) und hörten in ihrem Wachstum auf, wenn der ganze Boden der Flasche von ihnen bedeckt war. Nach ungefähr einem Monat verlangsamte sich das Wachstum der Zellen zunehmend. Später waren keine Mitosen mehr zu erhalten; die Zellen waren in ein stationäres Stadium eingetreten. In diesem Zustand verblieben die einzelnen Kulturen unterschiedlich lang. Sie wurden nicht mehr umgesetzt, sondern es wurde nur noch regelmäßig in größeren Abständen das Medium gewechselt. Die Zellen zeigten deutliche morphologische Veränderungen, wie starke Vakuolisierung oder das Auftreten von zahlreichen Zellfortsätzen. Es fanden sich vermehrt Riesenzellen. Ein Teil der Zellen ging zugrunde und löste sich ab.

Nach unterschiedlich langer Zeit (1 bis 6 Monate nach Ansetzen der Kultur) erschienen in diesen Kulturen schon makroskopisch als dichte weisse Punkte sichtbare Ansammlungen transformierter

Zellen. Diese unterschieden sich von den stationären Zellen durch ihre geringere Größe, ihre schärfere Abgrenzung von der Umgebung, ihren großen Gehalt an Granula und ihre sehr lebhafte mitotische Aktivität. Infolge des streng konzentrischen Wachstums an meist nur einer oder wenigen Stellen der Flasche wurden diese Zellansammlungen als Klone betrachtet. Es fanden sich zwar auch selten Flaschen, in welchen bis zu 200 derartiger Foci oder Klone aufgetreten waren; da diese aber in Größe, Zellzahl, Wachstum und morphologischen Eigenschaften alle nahezu identisch waren, ließ sich dieser Befund am einfachsten so interpretieren, daß hier beim letzten Umsetzen der stationären Kultur die Zellen eines bereits vorhandenen, aber noch sehr kleinen, Klons - der infolgedessen auch nicht entdeckt worden war - in der neuen Flasche gleichmäßig verteilt worden waren und dann entweder alle oder ein Teil von ihnen zur Bildung der zahlreichen Klone führten. Von diesen ersten Klonen lösten sich Zellen ab, welche in ihrer Umgebung zur Bildung neuer kleiner Herde von transformierten Zellen führten, bis schließlich die gesamte Flasche von den transformierten Zellen bewachsen

war und umgesetzt werden konnte. In diesem Stadium erwiesen sich die transformierten Zellen als sehr empfindlich gegen Milieu-Änderungen: Schon geringe Änderungen in pH und Temperatur im Brutschrank führten zum Untergang neu transformierter Stämme, während gleichzeitig sowohl Normalstämme als auch vor längerer Zeit transformierte Stämme im selben Brutschrank nicht beeinflußt wurden. Bei dieser Beobachtung muß jedoch offen bleiben, ob die größere Anfälligkeit frisch transformierter Zellen nur durch eine kleinere Zellzahl in diesem Stadium oder aber wirklich durch geringere Anpassungsfähigkeit dieser Zellen verursacht wurde.

Diese Transformationen zu permanentem Wachstum waren ein eindeutiges Ereignis, das in der Zellkultur zu einem klar erkennbaren Zeitpunkt festgestellt werden konnte. Hier liegt eine scharfe und deutliche Trennung vor zwischen der allmählich immer langsamer wachsenden Primärkultur, die schließlich ganz stationär wird, und dem plötzlichen und irreversiblen Umschlag zu permanentem Wachstum, das in dichten runden Herden, die wahrscheinlich Klone sind, von einer einzelnen oder

von nur wenigen Zellen ausgeht, die im Mikroskop von den langsam untergehenden nicht transformierten Zellen leicht unterschieden werden können. Ein solches Ereignis bezeichnen wir als Transformation, wobei betont werden muß, daß in der Literatur das plötzliche Auftreten von Klonen bei diesem Vorgang oft nur undeutlich oder gar nicht beschrieben wird.

Die Transformationen ereigneten sich in über 50 % aller angesetzten Kulturen, und zwar in verschiedenen Flaschen eines gleichen Ansatzes zu unterschiedlicher Zeit und in verschiedenen Brutschränken. Die transformierten Zell-Linien unterschieden sich voneinander in Wachstumsgeschwindigkeit und Morphologie. Die meisten waren vom Fibroblasten-Typ, ein Stamm von etwa 15 jedoch zeigte epitheliales Wachstum, d.h. die Zellen legten sich schon bei geringer Konzentration pflasterartig aneinander an.

Die Chromosomen-Untersuchungen ergaben für die frisch angesetzten Normalzellen stets den diploiden Karyotyp (Abbildung 1), wie dieser auch z.B. von LEHMAN (1963) (16), OHNO (1961) (63),

AWA (1959) (64) und anderen konstant gefunden wurde. Vor allem wurden mit Ausnahme eindeutig tetraploider Zellen keine Mitosen gefunden, die mehr als 44 Chromosomen - die normale Chromosomenzahl des Goldhamsters - aufgewiesen hätten. Auf eine umfangreiche Analyse von Normalzellen wurde deshalb verzichtet. Durchmusterungen ergaben Tetraploidien in einer Häufigkeit von unter 1 %; einmal wurde eine Endoreduplikation gesehen. An diesen Ergebnissen änderte sich auch im Verlaufe der Kulturen nichts, bis dann der Stillstand des Wachstums weitere Chromosomen-Analysen unmöglich machte.

Dagegen ergab sich bei den transformierten Stämmen ein anderes Bild. Alle untersuchten Stämme waren deutlich aneuploid. Diese Aneuploidie war schon sehr früh nach der Transformation vorhanden, nämlich bereits eine Woche nach dem Erkennen der Transformation - noch früher konnten wegen der zu geringen Zellzahl trotz zahlreicher Versuche keine Chromosomen-Präparationen gemacht werden. Es wurden keine euploiden Zellen gefunden. Innerhalb eines transformierten Stammes fanden sich Zellen ganz verschiedenen Karyotyps. Die transformierten Stämme zeigten ein hohes Maß chromo-

somaler Instabilität und Aberrationen: Deletionen von Chromatiden und Chromosomen, dizentrische Chromosomen, Minute-Chromosomen, Heterochromatinisierung, sekundäre Konstriktionen, Zusammenhängen mehrerer Chromosomen, Satelliten-Assoziationen, Polyploidie und bei zwei Transformationen aus derselben Primärkultur zwei Wochen nach Transformation sehr häufiges Auftreten von Endoreduplikationen (5 % aller Mitosen). Schließlich ließ sich nach längerer Kultur das Auftreten von Stammlinien mit zwischen 60 - 70 Chromosomen, also hyperdiploid und hypotetraploid, und deren Veränderungen im zeitlichen Verlauf beobachten.

Ergebnisse bei den einzelnen Stämmen:

Stamm BP vom 13.12.1967

Angesetzt am 14.12.67; Mediumwechsel am 18.12.; am 19.12. behandelt mit 4-fach-EAGLE's Medium-Benzpyren nach der Methode von BERWALD und SACHS (11) (10 mg Benzpyren in 1 ml Aceton gelöst und mit 100 ml 4-fach-EAGLE's Medium vermischt, dann 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt und dann 1:10 mit 4-fach

EAGLE's Medium versetzt); das Benzpyren wurde 9 Tage lang in den Flaschen gelassen. Transformation am 29.2.1968 (nach 5 Passagen, 1 Monat stationär, in dieser Zeit fünfmal Mediumwechsel). Der nicht mit Benzpyren behandelte Kontrollstamm transformierte dagegen nach 4 Monaten spontan.

(a) Untersucht am 21.3.1968, ausgewertet 50 Mitosen, siehe Tafel 1*:

Es zeigt sich eine sehr starke Streuung bei 2 kleinen Gipfeln, einer bei 60, der andere bei 65 Chromosomen.

(b) Untersucht am 9.6.1968, ausgewertet 39 Mitosen, siehe Tafel 2:

Die Streuung ist noch größer; nur sehr flache Gipfel, bei 64 - 70 Chromosomen. 8 Mitosen zeigen über 70, aber unter 100 Chromosomen.

(c) Untersucht am 1.7.1968, ausgewertet 106 Mitosen, siehe Tafel 3:

Ein völlig verändertes Bild: Sehr deutliches Überwiegen der Zellen mit 62 bis 65 Chromosomen, nur 5 über 70 Chromosomen, Tendenz zur Bildung einer Stammlinie.

---

* Tafeln und Abbildungen S. 60 ff.

(d) Untersucht am 2.3.1969, ausgewertet 112 Mitosen, siehe Tafel 4:

Deutliche Stammlinie bei 64 Chromosomen vorhanden, gute Annäherung an Gauss'sche Verteilung.

Es zeigt sich also nach anfänglich starken Unterschieden der einzelnen Zellen eine Tendenz zur Bildung einer stabilen Stammlinie, d.h. eine Selektion. Dabei wird jedoch nicht ein konstanter Karyotyp erreicht; das war auch nicht zu erwarten, da durch die häufigen Chromosomenmutationen, wie sie die einzelnen Zellen aufweisen, immer wieder zahlenmäßige Abweichungen nach oben oder unten auftreten müssen (Vereinigung zweier Chromosomen zu einem dizentrischen; Bruch eines Chromosoms in zwei neue Chromosome u.a.). Deshalb muß gefragt werden, ob die Streuung nicht schon mit der Fehlerbreite der Methode begründet werden kann: Es ergeben sich tatsächlich, auch wenn durch rigorose Auswahl alle technisch nicht einwandfreien Metaphasen eliminiert werden, immer noch Schwierigkeiten der Interpretation (z.B. dizentrisches Chromosom mit Deletion oder Zusammenlegung zweier Chromosomen an einer Chromatide?). Es wurde versucht, diese Fehlermöglichkeiten durch immer

gleichmäßige Bewertung auszuschalten. Alle Metaphasen wurden von derselben Person blind ausgewertet, wie überhaupt die ganze Chromosomendarstellung einschließlich der Photoarbeit immer vom gleichen Untersucher ausgeführt wurde.
Ein anderer methodischer Einwand wäre, daß durch die Präparation der Chromosomen, vor allem beim hypotonen Schock und beim Resuspendieren, einzelne Chromosomen aus Metaphasen herausgerissen würden. Dagegen spricht, daß in diesem Falle Karyotypen nur unter, nicht aber über einer bestimmten Chromosomenzahl gefunden werden dürften, da es sehr unwahrscheinlich ist, daß ein losgerissenes Chromosom sich an eine andere Metaphase anlegt. Außerdem müßte ein solcher seltener Fall erkannt werden, weil die Chromosomen verschiedener Mitosen sich in Größe, Form und Dichte deutlich voneinander unterscheiden, da kein Colchicin angewandt worden war. Selbst bei dicht nebeneinander liegenden Metaphasen ließ sich die Zugehörigkeit eines jeden einzelnen Chromosoms zur einen oder anderen Mitose immer zweifelsfrei erkennen. Es wurde aber nie ein zu einer anderen Mitose gehörendes einzelnes Chromosom in einer Metaphase festgestellt. Außerdem ließen sich die Zellgrenzen trotz der hypotonen Behandlung oft noch gut erkennen.

Ein weiterer Einwand besagt, daß die erhaltenen Metaphasen nicht repräsentativ für die gesamte Zellpopulation seien, sondern daß z.B. durch den hypotonen Schock besonders resistente Mitosen angereichert würden. Dagegen ist zu sagen, daß in zahlreichen Untersuchungen mit gleichzeitiger Verwendung anderer Techniken (z.B. Squash-Technik, photometrische DNS-Bestimmung, u.a.) bei vielen Objekten und von zahlreichen Untersuchern stets dieselben oder nur ganz gering divergierende Ergebnisse erreicht wurden. Zur Vermeidung von Selektionen war außerdem auf die Verwendung von Colchicin verzichtet worden. Trotzdem ist natürlich bei der Chromosomen-Analyse eine Selektion nicht ganz ausgeschlossen. Dies sollte aber bei den durchgeführten vergleichenden Untersuchungen nicht ins Gewicht fallen.

Morphologische Chromosomen-Veränderungen:

Da der Stamm BP 13.12.1967 gemäß den Untersuchungen vom 2.3.1969 (s. Tabelle) eine stabile Stammlinie bei nahezu gleichmäßiger Chromosomenverteilung erkennen ließ, wurden hier Art und Häufigkeit der morphologischen Chromosomen-Veränderungen bestimmt: Unter 100 ausgewählten Metaphasen zeigte sich

folgende Verteilung der Chromosomen und Chromatiden-Aberrationen: Es überwogen Chromatiden-Assoziationen und -translokationen (39 %), die gelegentlich nur schwer zu interpretieren waren. In 29 % der Fälle gefundene dizentrische Chromosomen konnten für diese Zell-Linie geradezu als Marker betrachtet werden, allerdings hatten sie oft ganz unterschiedliche Form und wechselnden Kinetochorenabstand. Minute-Chromosomen (azentrische Chromosomenfragmente) wurden zu 23 % beobachtet, einzeln liegende Chromatidenfragmente zu 21 %, sekundäre Konstriktionen zu 19 %. Überraschend war, daß Deletionen nur in 16 % der Mitosen beobachtet wurden. Satellitenassoziationen und Ring-Chromosomen kamen in je 3 % der Mitosen vor, Heterochromatin in nur 2 %. Die Häufigkeit der Aberrationen schwankt zwischen 0 (14 % aller Mitosen) und 6 je Mitose. Dabei wurden allerdings nur eindeutig als solche erkennbare Veränderungen bewertet. Interessant wäre zu untersuchen, ob diese Chromosomenmutationen bevorzugt in Zellen vorkommen, deren Karyotyp von dem der Stammlinie in der Zahl abweicht. In dem untersuchten Material scheint eine Tendenz dazu vorzuliegen; für eindeutige Aussagen hierüber müßte aber noch mehr

Material untersucht werden. Jedenfalls ließen sich so die Abweichungen von der Stammlinie und die möglichen Selektionen besonders einfach erklären.

Von dieser Kultur wurden auch Karyotypenanalysen gemacht. Einen ausgewählten Karyotyp zeigt die Abbildung 11* (vgl. Abb. 1 - Normaler Karyotyp). Wichtig erscheint hier, daß, wenn auch manche Chromosomen nicht sicher zu identifizieren sind und deshalb die Anordnung hier etwas schematisiert wurde, dennoch ganz eindeutig die Chromosomenvermehrung kein statistisches Ereignis war und auch nicht etwa ein einfacher triploider Karyotyp (-2 Chromosomen) vorliegt: Während die großen Metazentrischen und Subtelozentrischen (X u. 1-8) und die mittleren Akrozentrischen (16-19) jeweils nur zweifach vorkommen, sind die mittleren und kleinen Meta- und Subtelozentrischen sowie die kleinen Akrozentrischen deutlich bevorzugt vermehrt. Es findet sich ein Minute-Chromosom.

Stamm Hamsterembryo 21.2.1968

Insgesamt transformiert 6 von 8 Subkulturen; davon Chromosomen untersucht von

Subkultur 1: transformiert am 17.4.1968 (nach

---

* Abbildungen und Tafeln S. 60 ff.

56 Tagen Kultur, 6 Passagen, 3 Wochen lang stationär, einmal Medium gewechselt im stationären Zustand); Subkultur 2: transformiert am 12.5.1968 (nach 81 Tagen Kultur, 5 Passagen, 6 Wochen stationär, viermal Medium gewechselt im stationären Zustand).

Diese beiden spontan transformierten Subkulturen wurden kurz nach ihrer Transformation am 8.5. bzw. 9.6.1968 untersucht. Ergebnisse:
Subkultur 1 (T 1), untersucht am 8.5.1968, 97 Mitosen, siehe Tabelle 5. Es zeigt sich hier bereits eine gute Verteilung mit max. bei 68 und 69 Chromosomen je Mitose. Das Vorhandensein von 7 Mitosen mit unter 55 Chromosomen kann mit den in allen Kulturen oft beobachteten tripolaren Mitosen in Verbindung gebracht werden, es kann sich aber auch um untergehende oder zerrissene Zellen handeln. Jedenfalls sind sie dem normalen Karyotyp in Form und Aberrations-Häufigkeit nicht näher als die sich andeutende Stammlinie.
Subkultur 2 (T 2), untersucht am 9.6.1968, 97 Mitosen, siehe Tabelle 6. Hier zeigen sich zwei sich überlappende Stammlinien mit Maximum bei 63 und 66/67 Chromosomen. Auch hier finden sich sowohl über 70 als auch unter 60 an Häufigkeit

abnehmende einzelne Mitosen. Es finden sich zwei tetra- und eine hexaploide Mitose.
Diese beiden Subkulturen unterscheiden sich also in ihrem Karyotyp voneinander. Das besagt allerdings nicht, daß nicht beide in ihrem Ausgang identisch gewesen sein könnten. Wir haben ja am Beispiel des Stammes BP 13.12.1967 beobachtet, wie sehr sich Karyotyp bzw. Stammlinie in kurzer Zeit ändern, zumal in frisch transformierten Kulturen bei noch breitem Spektrum und weitgestreuter Chromosomenverteilung. Eine frappierende Ähnlichkeit zeigten die beiden Subkulturen in dem sehr hohen Prozentsatz von Endoreduplikationen (in beiden 5 %). Eine solche Identität könnte sowohl von der Zelle bzw. dem Tier her, als auch durch ein- und dasselbe transformierende Agens verursacht sein. Eine derartige Häufung von Endoreduplikationen ist aber bei spontan transformierten Hamsterembryozellen bisher erst in einem Fall beobachtet worden. Bei dem Stamm BP 13.12.1967 sowie drei weiteren darauf untersuchten Stämmen wurde keine einzige Endoreduplikation gesehen. Das verleitet zur Annahme, daß unabhängig vom transformierten Agens die Zellstämme bei Herkunft aus demselben Ansatz Gemeinsamkeiten haben.

Diese Endoreduplikationen sind bemerkenswert durch ihre Häufigkeit - bei den meisten früheren Chromosomenuntersuchungen wurde sie sehr selten gefunden; sie sind weiterhin interessant als einfacher Mechanismus für eine Polyploidisierung. Dabei halten sie sich in ihrer Verteilung an die entsprechend nur verdoppelte Stammlinie. Sie zeigen weiterhin aufschlußreiche Bilder von Aberrationen: Da stets homologe Chromosomen nebeneinander liegen (siehe Abbildung 2, 3) zeigt sich hier, wie aus einem metazentrischen Chromosom durch Bruch zwei telozentrische Chromosomen entstanden sein können. (Siehe Abbildungen 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10). Auch Translokalisationen waren hier deutlich erkennbar.

Die eine der beiden Subkulturen wurde weiter geführt (T 2). Sie zeigt jetzt seit einem Jahr einen konstanten epithelialen Zelltyp.

Diese Linie wurde am 21.2.1969 erneut untersucht. Siehe Tabelle 7.

Es wurden 208 Mitosen ausgewertet. Jetzt ist die Stammlinie noch ausgeprägter. 50 % aller Mitosen haben zwischen 64 und 66 Chromosomen. Der Gipfel liegt bei 66. Die Verteilung ist annähernd gleichmäßig. Trotz der vorher so zahlreichen

Endoreduplikationen liegen nur 5 Mitosen im Bereich der Tetraploidie. Immerhin wurden auch hier zwei Endoreduplikationen unter 1000 darauf untersuchten Mitosen gefunden, d.h. die Neigung dieser Linie zur Endoreduplikation war nicht nur ein schnell vorübergehendes Ereignis.

Die Analyse von 100 ausgewählten Metaphasen (HE 21.2.1969, Subkultur 2) ergab folgende Häufigkeit von Chromosomen-Strukturanomalien:

17 % ohne deutlich sichtbare Anomalien

38 % Minute-Chromosomen (als Minute-Chromosomen wurden Chromosomen gewertet, die um mindestens die Hälfte kleiner als das kleinste Normal-Chromosom waren und die deutlich aus zwei Teilen bestanden)

24 % Deletionen

19 % Chromatiden-Assoziationen } zusammen
17 % Chromatiden-Translokalisationen } 36 %

11 % Chromatiden-Fragmente

9 % Sekundäre Konstriktionen

8 % Dizentrische Chromosomen

2 % Satellitenassoziationen

Damit zeigt sich, daß in dem spontan transformierten Stamm die Chromosomenmutabilität ebenso

hoch ist, wie in dem mit Benzpyren behandelten. Unterschiedlichen Häufigkeiten einzelner Aberrationen möchten wir kein zu großes Gewicht beilegen, da es sich gezeigt hat, daß im Verlauf einer Kultur und wahrscheinlich in Abhängigkeit von Milieuänderungen die Verteilung und auch absolute Zahl von Chromosomenaberrationen schwanken kann.

Zu den hier analysierten 692 Mitosen wurde noch etwa diesselbe Zahl von Mitosen anderer spontan transformierter Stämme durchmustert. Auch die anderen Stämme (z.B. HE 13.12.1967 K, HE 22.4.1967, u.a.) waren hochgradig aneuploid und auch bei ihnen lagen die meisten Mitosen bei zwischen 60 und 70 Chromosomen; es wurde jedoch keine weitere Auswertung vorgenommen.

D i s k u s s i o n :

In der Literatur sind bis jetzt nur sehr wenige spontane Transformationen von Hamsterzellen beschrieben (3, 6, 7, 8, 13). Dabei gilt als Transformation im Sinne der Definition von KATHERINE K. SANFORD eine irreversible Veränderung in einer Zellkultur, die durch

verstärktes und permanentes Wachstum gekennzeichnet ist. Transformationen können durch Chemikalien oder Viren induziert sein oder ohne erkennbare Ursache spontan auftreten. Als Kriterium einer Transformation nennt K.K. SANFORD vermehrtes Wachstum, cytologische Veränderungen, Veränderungen im Karyotyp im Sinne der Aneuploidie, vermehrte Glykolyse, sogenannter Verlust von Kontaktinhibition, Focusbildung sowie die Entstehung von Tumoren (im allgemeinen Fibrosarkome) nach Injektion transformierter Zellen in isologe Tiere (4). Nach ihrer Meinung ist keine dieser Veränderungen in allen Systemen von absoluter Beweiskraft (K.K. SANFORD, 1967) (4). Die weit überwiegende Mehrheit aller beschriebenen transformierten Zell-Linien sind aber aneuploid. Diese Aneuploidie kann schon auftreten, bevor durch transplantierte Zellen Tumoren produziert werden (2). Allerdings ist die Entstehung von Tumoren aus transformierten Zellen nicht nur Ausdruck von Eigenschaften der Zellen, sondern in ebenso großem Maße von der Technik der Übertragung (Resistenz des Wirtstieres, Zahl der injizierten Zellen, Ort der Applikation, Tumorantigen, Histoinkompatibilität, u.a.) (29) abhängig. Deswegen und aus anderen Gründen

erscheint es uns günstiger, den Begriff 'Transformation' nicht mit dem der 'Malignität' zu verbinden, zumal auch neuere Befunde in der Literatur dagegen sprechen (Zusammenfassung s. bei JARRETT (70). Wir verstehen unter Transformation in unserem System ein gut definiertes Ereignis, nämlich das Auftreten von Klonen rasch und permanent wachsender Zellen in stationär gewordenen Primärkulturen. Diese transformierten Zellen sind bei uns immer aneuploid.

In der Literatur wird dies nicht so deutlich ausgesprochen. So findet sich z.B. bei John PAUL, Cell and tissue culture, Edinburgh, 3. Auflage, Seite 225, 1965: 'Primärkulturen sind üblicherweise diploid, aber dies ist ziemlich ungewöhnlich bei permanenten Stämmen'. Zum Teil ist diese Unklarheit sicher durch unterschiedliche Nomenklatur bedingt: So nennen einige Autoren einen permanenten Stamm, dessen Zellen in Chromosomenzahl und -verteilung stark variieren, noch diploid, wenn die Stammlinie in der Nähe der normalen Chromosomenzahl liegt. Auch der Zahl nach diploide Zellen können infolge deutlich sichtbarer Veränderungen der Chromosomenverteilung (z.B. Trisomie + Monosomie)

oder Chromosomenform in Wirklichkeit pseudo-diploid sein. Schließlich ist theoretisch auch noch denkbar, daß eine in den derzeitigen Methoden völlig normal erscheinende Zelle zahlreiche Chromosomen-Aberrationen wie etwa Inversionen und reziproke Translokationen aufweist, die wir nur noch nicht nachweisen können. Wir nennen eine Zelle aneuploid, wenn sie an ihrer Chromosomenzahl, -form und -verteilung deutlich von einer normalen diploiden oder tetraploiden Zelle unterschieden werden kann.

Da von zelltransformierenden Substanzen bekannt ist, daß sie sofort nach Applikation in normalen Zellen Chromosomenmutationen auslösen können, die nichts mit Transformation zu tun haben und da diese Effekte die Chromosomenveränderungen im Laufe der Transformation überlappen können, sind die Ergebnisse von Untersuchungen spontan transformierter Zellen auf Chromosomenveränderungen und deren Zusammenhang mit der in vitro-Transformation besonders interessant. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß nicht mit Sicherheit zu beweisen ist, daß nicht auch sogenannte spontane Transformationen durch bereits das Tier oder die Primärkultur befallende Viren oder

andere transformierende Ursachen hervorgerufen werden. Dagegen spricht jedoch etwas die Seltenheit des Ereignisses, bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen der Primärkultur.
Manche Autoren hatten angenommen, daß spontane Transformationen bei Hamsterembryonal-Kulturen nicht oder nur sehr selten auftreten können (SACHS, L., 1965 (12); DEFENDI, V., 1965 (66, 67); SANFORD, K., 1965 (2, 65). In neuerer Zeit sind jedoch einige Fälle von spontaner Transformation von Hamsterembryonal-Zellen beschrieben worden, so daß an dieser Möglichkeit nicht mehr gezweifelt werden kann. Wesentlich scheinen hier die Kulturbedingungen zu sein. DIAMOND (1966) (7) beschreibt zwei Subkulturen von Hamsterembryozellen, die nach der 35. Passage (18 Wochen) bzw. nach ungefähr 70 Passagen bei neu geborenen Hamstern Tumoren verursachten. Hier war vor dem Auftreten der Transformation (nachgewiesen durch die verursachten Tumoren) kein Wachstumsstillstand beobachtet worden, dem dann das Auftreten isolierter, schnell wachsender Klone gefolgt wäre, wie das von TSUDA (1965) (8) bei seinen beiden spontanen Transformationen beobachtet worden war. Beide Zell-Linien von DIAMOND zeigten eine Zunahme

abnormer Metaphasen im Verlaufe ihres Wachstums, die Chromosomenzahl bewegte sich jedoch noch nach 125 Passagen im Bereich zwischen 40 und 50. Es wurden hier aber nie mehr als 25 Metaphasen analysiert, insgesamt für beide Kulturen 129 Metaphasen bei 6 verschiedenen Chromosomenanalysen.

Weitere Transformationen von Hamsterembryonalzellen wurden von GOTLIEB-STEMATSKY (1965) (6) beschrieben. Hier wurden Hamsterembryonalzellen so dünn ausgesät, daß keine zusammenhängende Zellschicht erschien, sondern langsam einzelne kleine Kolonien auftraten. 65 Kolonien dieser Art wurden in Leighton-Röhrchen umgesetzt, von welchen 4 Klone weiteres Wachstum zeigten. Nach 8 bis 9 weiteren Passagen konnte von 3 dieser Zell-Linien in Hamstern Tumoren erzeugt werden, eine Linie ging verloren. Mit Zellen aus nichtklonierten Kulturen konnten niemals Tumoren produziert werden. Chromosomen-Untersuchungen wurden hier nicht vorgenommen.

KATHARINE SANFORD (1967) (3) konnte bei gleichfalls nicht behandelten Hamsterembryonalzellen mit drei Zell-Linien nach 6 1/2, 12 und 13 Monaten in bestrahlten Hamstern Sarkome erzeugen.

Mit Kontrolluntersuchungen ergeben sich insgesamt sieben spontan transformierte Zell-Linien aus fünf verschiedenen Ansätzen von Hamsterembryonalzellen, dazu ein von zwei Zellen ausgehender Klon mit spontaner Transformation.
Nach ihrer Meinung ist das Scheitern früherer Versuche, bei Hamstern spontane Transformationen zu erzielen (BERWALD, Y. und SACHS, L., 1965) (11) durch ungeeignete Kulturbedingungen und speziell durch zu häufiges Trypsinieren und Anlegen von Subkulturen zu erklären. Auch nach ihren Beobachtungen werden Hamsterembryonalzellen nach einer initialen Phase raschen Wachstums zunehmend stationär. In diesem Stadium sollen sie möglichst wenig oder gar nicht umgesetzt werden. Im Anschluß an diese Adaptationsphase, die mehrere Wochen bis Monate dauern kann, lassen sich nach ihrer Auffassung routinemäßig rasch wachsende permanente Zell-Linien etablieren. Dies entspricht auch der eigenen Laborerfahrung.

In einer weiteren Arbeit (1967) (4) werden von ihr Chromosomenuntersuchungen dieser spontan transformierten Hamsterembryonal-Zell-Linien beschrieben. Alle Linien waren aneuploid mit einer weiten

Streuung der Chromosomenzahlen zwischen 40 und 50. An Strukturveränderungen fand sie das Auftreten von dizentrischen Chromosomen (1,5 bis 5,2 %), Minute-Chromosomen (1,5 bis 12,1 %), Chromatidenbrüche (0 bis 1,9 %) und Endoreduplikationen (1,5 bis 6,9 %). Dabei wurden zwischen 54 und 66 Zellen untersucht. Für die Bestimmung des Karyotyps wurde dieselbe Zahl von Metaphasen ausgewertet (3 Stämme - insgesamt 167 Metaphasen). Hier ergab sich bei einer Linie das Auftreten einer Stammlinie bei 45 bis 46 (breite Streuung zwischen 40 und 50) mit anderen Metaphasen bei 80, 88 und 90-100 Chromosomen. Bei den beiden anderen untersuchten Linien bleiben die Stammlinien zwischen 80 und 90 und 90 und 100 Chromosomen.

Die spontane Transformation in dem von uns untersuchten System, wie z.B. der beiden Subkulturen 21.2.1968 ist am meisten den von KATHARINE SANFORD beobachteten vergleichbar. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von DIAMOND war hier Wachstumsstillstand mit nachfolgendem Auftreten kleiner Klone zu erkennen. Die spontanen Transformationen bei uns waren sehr

häufig (über 50 % nach der Laborerfahrung) und waren in ihrem Beginn deutlich erkennbar, während bei DIAMOND ein fliessender Übergang von der Normallinie zur transformierten beobachtet wurde. Die Arbeiten von GOTLIEB-STEMATSKY sind schwierig zu vergleichen; es ist möglich, daß in seinem System andere transformierende Faktoren eine Rolle spielen. Wichtig erscheint, daß auch bei ihm wie bei SANFORD und dem eigenen System ein klonales Stadium, wenn auch bei ihm schon sehr früh, zur spontanen Transformation gehörte.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:
Nach dem allmählichen Wachstumsstillstand der diploiden Hamsterembryozellen zeigen die in Form von Klonen spontan auftretenden transformierten Zell-Linien ebenso wie die mit BP behandelten bereits in den frühesten zu beobachtenden Stadien eine deutliche und ausgeprägte Aneuploidie. Zu diesem Zeitpunkt sind keine euploiden Mitosen mehr zu finden. Chromosomenmutationen sind ausgesprochen häufig. Die beiden Subkulturen aus demselben Ansatz, die zu verschiedenen Zeitpunkten, in verschiedenen Brutschränken und bei verschiedener

Behandlung (unterschiedliche Häufigkeit des Mediumwechsels, unterschiedliche Dauer der Passagen) sich spontan transformierten, zeigen bei Ähnlichkeit der Chromosomenverteilung (zwischen 60 und 70) eine frappierende Übereinstimmung, nämlich eine sehr hohe Frequenz (5 %) von Endoreduplikationen. Diese Endoreduplikationen folgen in ihrer Verteilung der Chromosomenverteilung der anderen Zellen. Es zeigt sich im Verlauf der Kulturen eine Tendenz zur Bildung deutlicher Stammlinien. Die Häufigkeit der Endoreduplikationen nimmt stark ab. Bis auf die Endoreduplikationen zeigt der nach der Methode von BERWALD und SACHS mit Benzpyren (11) behandelte Stamm ein sehr ähnliches Verhalten. Auch hier sind keine normalen Karyotypen mehr zu finden. Auch hier treten nach anfangs sehr stark gestreuter Aneuploidie Stammlinien auf, deren Gipfel zwischen 60 und 70 Chromosomen liegen. Da SACHS und Mitarbeiter in ihren Systemen der Transformation mit Benzpyren und Polyomavirus keine Chromosomenuntersuchungen vorgenommen haben, lassen sich diese Befunde nicht gegenüberstellen.

Wenn man von zufälligen Einzelbeobachtungen (6, 7, 8, 13) absieht, ist das hier untersuchte System von H. FRIEDRICH-FREKSA unseres Wissens neben dem von K. SANFORD (3) das einzige, in welchem spontane Transformationen von Hamsterembryozellen regelmäßig gefunden werden. Chromosomenuntersuchungen an spontan transformierten Hamsterembryozellen waren bis jetzt zwei (3, 7) bekannt. Die Arbeiten stimmen mit der vorliegenden in der Feststellung von Aneuploidie, häufigen Chromosomenaberrationen sowie dem Auftreten von Stammlinien überein. Die Chromosomenzahl der Stammlinien bewegte sich bei ihnen zwischen 40 und 50 (129 bzw. 167 Metaphasen ausgewertet), während bei uns bei der Auswertung von 385 Mitosen die Stammlinien zwischen 60 und 70 Chromosomen je Mitose lagen. Derartige Unterschiede können einfacher Zufall sein oder durch Unterschiede in den verwendeten Systemen verursacht sein; dafür spräche, daß bei uns auch die mit Benzpyren behandelten Zell-Linien Stammlinien mit zwischen 60 und 70 Chromosomen aufweisen (insgesamt 307 Metaphasen).

Die gefundenen Chromosomenveränderungen gewähren anscheinend den transformierten Zellen Selektionsvorteile. Daß Selektionen in Zell-Linien auftreten

können, konnte schon 1960 von MARGARETHE VOGT(72) in grundlegenden Untersuchungen gezeigt werden. Auch die hier gezeigte zunehmende Tendenz zu Stammlinien muß auf Selektionen beruhen. Was für Mechanismen es sind, die diese Selektionen bewirken, ist im einzelnen hier unbekannt. Sie hängen z.B. sehr stark von den jeweiligen Kulturbedingungen ab. Die Vermehrung von genetischem Material, die ein Kennzeichen der meisten transformierten Linien ist, sichert die Zellen gegen die sicher häufigen Mutationen in vitro, da die Gene für die in vitro benötigten minimalen Zellfunktionen hier wahrscheinlich vorhanden sind. Je mehr genetisches Material vorhanden ist, um so größer sind umgekehrt die Chancen von Zellen, sich wieder infolge von Mutationen an extreme Bedingungen anpassen zu können (LEVAN, A., 1966, in "Some current problems of cancer cytogenetics") (42). Andererseits wachsen oft Zellen mit größerer Chromosomenzahl langsamer. So kann sich je nach Kulturbedingungen ein Gleichgewicht in der Zahl der Chromosomen einstellen, das dann in einer Stammlinie seinen Ausdruck findet. Die zahlreichen Chromosomenmutationen geben

die Möglichkeit der Anpassung an veränderte Bedingungen und sichern so ebenfalls den Fortbestand der Zell-Linie.

Durch die Aneuploidie sowie die erhöhte Chromosomenmutabilität der Zellen, die nicht mehr durch das Filter der Meiose hindurchmüssen, ergibt sich in transformierten Zell-Linien wie auch in Tumoren ein Zusammenspiel von Evolution und Selektion auf der Ebene der Zelle. Es stellt sich die Frage, wieweit die in vitro-Befunde der Transformation zu permanentem Wachstum mit der Carcinogenese in vivo vergleichbar sind. Vielleicht ergeben sich Anhaltspunkte aus einer neuen Arbeit von BRAND (71), der mit dem relativ gut überschaubaren Modell der Carcinogenese in vivo durch Kunststoffimplantationen arbeitet. Er findet ein Ruhestadium ohne Zellteilungen, bis der bereits zuvor vorhandene 'prämaligne' Klon plötzlich stark zu wachsen beginnt und zum Tumor führt. Aus einzelnen Klonen entstandene Tumoren gleichen sich untereinander in ihrer Stammlinie und ihrem Wachstumsverhalten stark. Dieses Modell zeigt Ähnlichkeiten mit unserem in vitro-System. Weitere Untersuchungen wären hier von Interesse.

Es ist aber jetzt schon sicher, daß klonales Wachstum in Stammlinien, Aneuploidie und Chromosomeninstabilität auch im Laufe des Wachstums vieler Karzinome wichtige Faktoren für ihren Verlauf und ihre Eigenschaften darstellen. Aus ihnen kann die hohe Anpassungsfähigkeit auch gegenüber der Therapie erklärt werden.

S t a t i s t i k

Um Aussagen über die Zellkulturen statistisch sichern zu können, muß man von einigen Voraussetzungen ausgehen:

1. daß der Zeitpunkt der Teilung einer Zelle nicht von ihrer Chromosomenzahl abhängt,
2. daß Zellen unterschiedlicher Chromosomenzahl sich während der Verfahren zur Darstellung des Karyotyps nicht unterschiedlich verhalten,
3. daß eine gute Ausbreitung der Chromosomen und damit ihre Auswahl zur Analyse nicht von der Chromosomenzahl abhängt.

Es müssen also Selektionen ausgeschlossen werden. Aber auch wenn diese Voraussetzungen nicht bewiesen werden können oder nicht zutreffen,können mit derselben Methodik gewonnene Daten miteinander verglichen werden, wenn man sich vor Augen hält, daß die Ergebnisse nicht unbedingt für alle Zellen einer Kultur zutreffen, sondern nur für die mit dieser Methodik untersuchte Population. Zu 3. ist noch zu bemerken, daß hier eine Einschränkung schon infolge des Ausscheidens von Metaphasen mit unter 40 Chromosomen gemacht werden muß; zum anderen ist ganz zweifellos ab einer gewissen Chromosomenzahl die Auswertbarkeit von Metaphasen zunehmend vermindert. Deshalb werden bei der

statistischen Untersuchung Zellen, die ein Mehrfaches der häufigsten Chromosomenzahlen aufweisen (hier willkürlich definiert als alle Metaphasen mit über 90 Chromosomen), ausgeschieden. Schließlich werden nur diejenigen Chromosomenanalysen ausgewertet (HE 21. 2. 68, untersucht am 8. 5. 68, 9. 6. 68 und 21. 2. 69 sowie BP 13. 12. 67, ausgewertet am 1. 7. 68 und 2. 3. 69),bei denen infolge einer ausreichenden Zahl untersuchter Metaphasen das Vorliegen einer Gauß'schen Verteilung angenommen werden kann.

Ergebnisse :

1. Varianzanalyse-Kenngrößen

(BP 1. 7. 68 = BP 1, BP 2. 3. 69 = BP 2, HE 8. 5. 68 = HE 1, HE 9. 6. 68 = HE 2, HE 21. 2. 69 = HE 3)

BP 1	BP 2	HE 1	HE 2	HE 3
n				
106	112	92	86	203
Summe				
6711.00	7075.00	6074.00	5541.00	13100.00
Mittelwert				
63.3113	63.1696	66.0217	64.4302	64.5320
Summe der Abweichungsquadrate				
2766.81	719.88	3308.06	2451.19	3068.69
Varianz				
26.3506	6.4854	36.3523	28.8375	15.1915
Standardabweichung				
5.1333	2.5466	6.0293	5.3701	3.8976
Varianzkoeffizient				
8.11	4.03	9.13	8.33	6.04

BP 1	BP 2	HE 1	HE 2	HE 3
Standardabweichung des Mittelwerts				
0.4985	0.2406	0.6286	0.5791	0.2736

2. F- Test (Vergleich der Variabilität der Gruppen)

	BP 1	BP 2	HE 1	HE 2	HE 3
BP 1		++	-	-	++
BP 2			++	++	++
HE 1				-	++
HE 2					++

(- = kein signifikanter Variabilitätsunterschied nachweisbar, + = signifikanter Unterschied(Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5%), ++ = hochsignifikanter Unterschied (Irrtumswahrscheinlichkeit unter 1%))

3. Multipler t- Test

(da der t- Test gleiche Variabilität der Gruppen zur Voraussetzung hat, konnen nur 3 Gruppen miteinander verglichen werden)

	BP 1	BP 2	HE 1	HE 2	HE 3
BP 1			++	-	
BP 2					
HE 1				+	
HE 2					
HE 3					

4. U- Test nach MANN-WHITNEY

(dieser Test ist verteilungsfrei, d. h. die Daten müssen nicht wie im t- Test normal verteilt und homogen variant sein)

U- Test

	BP 1	BP 2	HE 1	HE 2	HE 3
BP 1		+	++	-	++
BP 2			++	++	++
HE 1				++	++
HE 2					-
HE 3					

Es lassen sich also unter anderem folgende Aussagen machen:

Die Variabilität einer Chromosomenverteilung ändert sich mit der Dauer der Kultur deutlich (hochsignifikant im F- Test), und zwar im Sinne einer Verminderung der Streuung, d. h. die Stammlinie wird schärfer ausgeprägt (Vergleich HE 9. 6. 68 und HE 21. 2. 69, und BP 1. 7. 68 und BP 2. 3. 69)

Zwischen der Chromosomenverteilung des mit Benzpyren behandelten Zellstammes und der aus einem anderen Ansatz stammenden nicht behandelten Linie besteht weder in der Variabilität noch in der Verteilung der Chromosomenzahlen ein signifikanter Unterschied (F- Test, t- Test und U- Test Vergleich BP 1. 7. 68 und HE 9. 6. 68); erst nach längerer Kulturdauer findet sich in beidem ein hochsignifikanter Unterschied (F- Test, t- Test und U- Test Vergleich BP 2. 3. 69 mit HE 21. 2. 69).

Gleichzeitig besteht zwischen den Stammlinien der beiden aus dem gleichen Ansatz stammenden Subkulturen (HE 8. 5. 68 und HE 9. 6. 68) ein im t- Test signifikan-

ter, im U- Test hochsignifikanter und im F- Test ebenfalls hochsignifikanter Unterschied.

Da die beiden Subkulturen des spontan transformierten Stammes untereinander so deutlich verschieden sind, während zugleich gegenüber dem nach Benzpyren-Behandlung transformierten Stamm die eine (Vergleich HE 9. 6. 68 mit BP 1. 7. 68) keine signifikanten Unterschiede aufweist, die andere Subkultur jedoch (Vergleich HE 8. 5. 68 mit BP 1. 7. 68) bei ähnlicher Variabilität hochsignifikante Unterschiede im t- Test und F- Test zeigt, ist es wahrscheinlicher, daß auch die späteren Unterschiede zwischen dem mit Benzpyren behandelten und dem spontan transformierten Stamm (Vergleich HE 21. 2. 69 mit BP 2. 3. 69) nicht von der unterschiedlichen Behandlung oder der Herkunft aus unterschiedlichen Kulturansätzen verursacht werden, sondern durch zufällige Selektionen nach der Transformation entstanden sind.

Interessant ist noch, daß zwischen den Ergebnissen der frühen und der späteren Untersuchung desselben Stammes (Vergleich HE 9. 6. 68 mit HE 21. 2. 69) zwar in der Variabilität ein hochsignifikanter Unterschied auftritt, sich zwischen den beiden Gruppen selbst jedoch im U- Test kein signifikanter Unterschied nachweisen läßt. Am einfachsten läßt sich dieser Sachverhalt damit erklären, daß sich die gleiche Stammlinie mit einer immer geringeren Streuung zunehmend an die Kulturbedingungen anpaßt.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit einer IBM-Datenverarbeitungsanlage (IBM 360-30) nach Standardprogrammen für den multiplen t- Test, U- Test und F- Test durchgeführt.

Literatur zur Statistik

L.Cavalli-Sforza

Biometrie.
Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik.
Zweite, durchgesehene Auflage 1969
G.Fischer Verlag Stuttgart

G.A.Lienert

Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik.
Erste Auflage 1962
Verlag A.Hahn Meisenheim am Glan

A.Goldstein

Biostatistics.
Erste Auflage 1964
Collier-MacMillan Ltd. Toronto, Ontario

D.Winne

Zur Auswertung von Versuchsergebnissen.
Arzneimittelforschung 17, 93, 1967

Zusammenfassung

Es wird ein neues System der in-vitro-Kultur von Hamsterembryonalzellen beschrieben. In ihm ereignen sich spontan wie auch nach Behandlung mit Benzpyren klonale Transformationen zu permanentem Wachstum. Dabei entstehende transformierte Zellstämme werden einmalig oder wiederholt in ihrem Verlauf cytogenetisch untersucht. Insgesamt werden siebenhundert Metaphasen ausgewertet. Es zeigt sich bei allen transformierten Stämmen eine deutlich ausgeprägte Aneuploidie. Die Zellen weisen zahlreiche Chromosomenaberrationen auf, die beschrieben und in ihrer Häufigkeit analysiert werden. In jeder Metaphase läßt sich im Durchschnitt eine Aberration erkennen. Es treten mit zunehmender Dauer der Kultur immer deutlicher ausgeprägte Stammlinien mit immer geringerer Streuung auf. Die mittlere Chromosomenzahl der Zellpopulationen dieser Stammlinien liegt zwischen 60 und 70 Chromosomen. Der nach Benzpyrenbehandlung transformierte Zellstamm zeigt im Vergleich mit einem spontan transformierten Stamm zunächst in seiner Chromosomenverteilung keinen statistisch signifikanten Unterschied. Dagegen unterscheiden sich zwei Subkulturen aus demselben Ansatz, die unabhängig voneinander spontan transformierten, in hochsignifikanter Weise, zeichnen sich aber beide durch ein ungewöhnlich hohes Maß an Endoreduplikationen aus, die sonst bei den anderen Stämmen nicht gesehen wurden. Die Ergebnisse werden

statistisch kontrolliert und gesichert. Die Literatur über Transformationen von Hamsterembryozellen in vitro wird zusammengestellt und im Hinblick auf die eigenen Untersuchungen kritisch diskutiert. Die Bedeutung von Chromosomenmutationen für Selektionen in Zellkulturen wird unterstrichen.

L i t e r a t u r

(1) BOVERI, Th.
Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.
Fischer, Jena, 1914

(2) SANFORD, K.K.
Malignant transformation of cells in vitro.
in: International Review of Cytology (Bourne, G.H. and J.F. Danielli, eds.), New York and London, Academic Press, Inc., 1965, pp. 249-311

(3) SANFORD, K.K. and R.E. HOEMANN
Neoplastic transformation of mouse and hamster cells in vitro with and without polyoma virus.
J.Nat.Cancer Inst., 39, 691, 1967

(4) SANFORD, K.K., B.E. BARKER, M.W. WOODS, R. PARSHAD and L.W. LAW
Search for 'indicators' of neoplastic conversion in vitro.
J.Nat.Cancer Inst., 39, 705-733, 1967

(5) SANFORD, K.K.
'Spontaneous' neoplastic transformation of cells in vitro: Some facts and theories.
Nat. Cancer Inst. Monograph, 26, 387-418, 1967

(6) GOTLIEB-STEMATSKY, T., A. YANIV and A. GAZITH
Spontaneous malignant transformation of hamster embryo cells in vitro.
J.Nat.Cancer Inst., 36, 477-482, 1966

(7) DIAMOND, L.
Two spontaneously transformed cell lines derived from the same hamster embryo culture.
Int.J.Cancer, 2, 143-152, 1967

(8) TSUDA, T.
Establishment of two cell lines from Syrian hamster embryonic tissue in vitro.
Tohoku J.exp.Med., 86, 171-180, 1966

(9) YAMANE, I. and T. TSUDA
Malignant transformation and chromosome change of two cell lines from Syrian hamster embryonic tissue in vitro.
Tohoku J.exp.Med., 88, 171-180, 1966

(10) SACHS, L. and D. MEDINA
In vitro transformation of normal cells by polyoma virus.
Nature (London), 189, 457-458, 1961

(11) BERWALD, Y. and L. SACHS
In vitro cell transformation with chemical carcinogens.
Nature (London), 200, 1182-1184, 1963

(12) BERWALD, Y. and L. SACHS
In vitro transformation of normal cells to tumour cells by carcinogenic hydrocarbons.
J.Nat.Cancer Inst., 35, 641-661, 1965

(13) KUROKI, T. and H. SATO
Transformation and neoplastic development in vitro of hamster embryonic cells by 4-nitroquinoline-1-oxide and its derivates.
J.Nat.Cancer Inst., 41, 53-65, 1968

(14) PARSHAD, R. and K.K. SANFORD
Effect of horse serum, fetal calf serum, calf serum, bovine serum, and fetuin on neoplastic conversion and chromosomes of mouse embryo cells in vitro.
J.Nat.Cancer Inst., 41, 767-779, 1968

(15) SANDRITTER, W., G. HILWIG, K. ENGELBART, G. KIEFER und R. KIEFER
Versuche zur Carcinogenese in vitro.
Z. Krebsforsch., 67, 57-68, 1965

(16) LEHMAN, J.M., J. MACPHERSON and P.S. MOORHEAD
Karyotype of the Syrian hamster.
J.Nat.Cancer Inst., 31, 639-649, 1963

(17) HAYFLICK, L. and P.S. MOORHEAD
The serial cultivation of human diploid cell strains.
Exp.Cell.Res., 25, 585-621, 1961

(18) STOKER, M. and J.MACPHERSON
Syrian hamster fibroblast line BHK 21 and its derivatives.
Nature (London), 203, 1355-1357, 1964

(19) TRAYKOVICH, V.
A transplantable hamster sarcoma produced by spontaneously transformed kidney cell line of baby hamster.
J.Nat.Cancer Inst., 41, 1039-1043, 1968

(20) GEY, G.O.
Cytological and cultural observations on transplantable rat sarcomata produced by inoculation of altered normal cells maintained in continuous culture.
Cancer Res. 1, 737, 1941

(21) EARLE, W.R. and A. NETTLESHIP
Production of malignancy in vitro. V. Results of injections of cultures into mice.
J.Nat.Cancer Inst., 4, 213-227, 1943

(22) NOWELL, P.C.
Phytohemagglutinin: Initiator of mitosis in cultures of normal leucocytes.
Cancer Res., 20, 462, 1960

(23) TIJO, J.H. and A. LEVAN
Chromosome number of man.
Hereditas, 42, 1, 1956

(24) HSU, T.C. and C.M. POMERAT
Mammalian chromosomes in vitro: II. Method for spreading chromosomes of cells in tissue culture.
J. Hered., 40, 23, 1953

(25) HSU, T.C. and O. KLATT
Mammalian chromosomes in vitro: IX. On genetic polymorphism in cell populations.
J.Nat.Cancer Inst., 21, 437, 1958

(26) LEJEUNE, J., R. TURPIN and M. GAUTIER
Le mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine.
Ann. génet., 2, 41, 1959

(27) HAYFLICK, L.
The limited life span of human diploid cell strains.
Exp.Cell Res., 37, 614-636, 1964

(28) BAYREUTHER, K.
Chromosomes in primary neoplastic growth.
Nature, 186, 6, 1960

(29) McCARTHY, R.E.
'Spontaneous' malignant transformation in vitro of adult mice cell lines: Effect of site of implantation on expression of cell antigenicity and malignancy.
Cancer Res., 28, 615, 1968

(30) EAGLE, H.
Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.
Science, 122, 501-504, 1955

(31) ROTHFELS, K.H. and L. SIMONOVITCH
An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro.
Stain Techn., 33, 73, 1958

(32) NACHTIGAL, M., N.C. POPESCU and S. NACHTIGAL
Chromosomes of tumours induced by 3-methylcholanthrene in the golden hamster.
J.Nat.Cancer Inst., 38, 697, 1967

(33) MOORHEAD, P.S. and P.C. NOWELL
Chromosome cytology.
Methods Med. Res., 10, 310-322, 1964

(34) FERGUSON, J.
Chromosome studies of human cells in tissue culture.
Med.J.Aust., 49(1), 40-43, 1962

(35) MILES, C.P., F.O. O'NEILL, D. ARMSTRONG, B. CLARKSON and J. KEANE
Chromosome patterns of human leucocyte established cell lines.
Cancer Res., 28, 481-490, 1968

(36) MILES, C.P. and F. O'NEILL
Chromosome studies of 8 in vitro lines of Burkitt's lymphoma.
Cancer Res., 27, 392-402, 1967

(37) ORSINI, M.W. and B. PANSKY
The natural resistance of the golden hamster to colchicine.
Science, 115, 88-89, 1952

(38) DIPAOLO, J.A., A.S. RABSON and R.A. MALMGREN
In vitro viral transformation of chemically transformed cells.
J.Nat.Cancer Inst., 40, 757-770, 1968

(39) BLACK, P.H. and G.J. TODARO
In vitro transformation of hamster and human cells with the adeno-7-SV_{40} hybrid virus.
Proc.Nat.Acad.Sci. US, 9, 374, 1965

(40) COOPER, H.L. and P.H. BLACK
Cytogenetic studies of three clones derived from a permanent line of hamsters transformed by SV_{40}.
J.Cell.Comp.Physiol., 64, 201, 1964

(41) TOMKINS, G.A. and D. PYE
Changes in simian virus 40 susceptibility and chromosome numbers during long-term cultivation of BS-C-1 cells.
J.Nat.Cancer Inst., 40, 91-96, 1968

(42) LEVAN, A.
Some current problems of cancer cytogenetics.
Hereditas, 57, 345-355, 1967

(43) STEENIS, H. van
Chromosomes and cancer.
Nature, 209, 819-821, 1966

(44) NICHOLS, W.W.
Relationships of viruses, chromosomes and carcinogenesis.
Hereditas, 50, 53-80, 1963

(45) LEVAN, A.
Non-random representation of chromosome types in human tumour stem lines.
Hereditas, 55, 28-38, 1966

(46) MOORE, G.E. and A.A. SANDBERG
Studies of a human tumour cell line with a diploid karyotype.
Cancer, 17, 170-175, 1962

(47) DAVIDSON, E.H.
Differentiation in monolayer tissue culture cells.
Advan.Genet., 12, 143-280, 1964

(48) NOWELL, P.C., H.P. MORRIS and V.R. POTTER
Chromosomes of 'minimal deviation' hepatomas and some other transplantable rat tumours.
Cancer Res., 27, 1565, 1967

(49) HSU, T.C.
Chromosomal evolution in cell populations.
Intern.Rev.Cytol., 12, 69-161, 1961

(50) NOWELL, P.C.
Chromosome changes in primary tumours.
Progr.Exptl.Tumour Res., 7, 83-103, 1965

(51) NOWELL, P.C. and D.A. HUNGERFORD
Chromosomes changes in human leukemia and a tentative assessment of their significance.
Ann.N.Y.Acad.Sci., 113, 645-662, 1964

(52) SANDBERG, A.A.
The chromosomes and causation of human cancer and leukemia.
Cancer Res., 26, 2069-2081, 1966

(53) MILES, C.P.
Chromosomes of solid tumor I
28 non-epithelial tumors.
Cancer, 20, 1253-1273, 1967

(54) MILES, C.P.
Chromosomes of solid tumors II
26 epithelial tumors.
Cancer, 20, 1274-1287, 1967

(55) HELLRIEGEL, K.P.
Chromosomenbefunde bei myeloproliferativen Erkrankungen.
Internist, 9, 465-470, 1968

(56) TURPIN, R. et J. LEJEUNE
Les chromosomes humaines.
Gauthier Villars, édit., Paris 1965

(57) AUERSPERG, N., M.J. COREY and A. WORTH
Chromosomes in preinvasive lesions of the human uterine cervix.
Cancer Res., 27, 1394-1401, 1967

(58) YOSIDA, T.H., H.T. IMAI and M. POTTER
Chromosomal alteration and development of tumours. XIX Chromosome constitution of tumour cells in 16 plasma cell neoplasms of BALB/C mice.
J.Nat.Cancer Inst., 41, 1083-1097, 1968

(59) FORD, C.E. and J.L. HAMERTON
A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes.
Stain Techn., 31, 247-251, 1966

(60) STEWART, S.E., LOVELACE, E., J.J. WHANG and V.A. NGU
Burkitt tumor: tissue culture, cytogenetic and virus studies.
J.Nat.Cancer Inst., 34, 319-327, 1965

(61) ATKIN, N.B. and M.C. BAKER
Chromosome abnormalities as primary events in human malignant disease: Evidence from marker chromosomes.
J.Nat.Cancer Inst., 36, 539-557, 1966

(62) MOORHEAD, P.S., P.C. NOWELL, W.J. MELLMAN, D.M. BATTIPS and D.A. HUNGERFORD
Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.
Exp.Cell Res., 20, 613, 1960

(63) OHNO, S. and C. WEILER
Sex chromosome behavior pattern in germ and somatic cells of Mesocricetus auratus.
Chromosoma, 12, 362-373, 1961

(64) AWA, A., M. SASAKI and S. TAKAYAMA
An in vitro study of the somatic chromosomes in several mammals.
Jap.J.Zool., 12, 257-265, 1959

(65) TODARO, G.J., K. NILAUSEN and H. GREEN
Growth properties of polyoma-virus induced hamster tumor cells.
Cancer Res., 23, 825-832, 1963

(66) DEFENDI, V. and J.M. LEHMAN
Transformation of hamster embryo cells in vitro by polyoma virus: morphological, karyological, immunological and transplantation characteristics.
J.cell.comp.Physiol., 66, 183-198, 1965

(67) DEFENDI, V.
Transformation in vitro of mammalian cells by polyoma and simian 4o viruses.
Progr.exp.Tumor Res., 8, 125-188, 1966

(68) NOWELL, P.C. and D.A. HUNGERFORD
Minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.
Science, 132, 1497, 1960

(69) KATO, R. M. BRUZE and T. YELVERTON
Chromosome breakage induced in vivo by a carcinogenic hydrocarbon in bone marrow cells of the Chinese hamster.
Hereditas, 61, 1, 1969

(70) JARRETT, O and J. MACPHERSON
The basis of the tumorigenicity of BHK 21 cells.
Int.J.Cancer, 3, 654, 1968

(71) BRAND, K.G., L.C. BUVEN and J. BRAND
Carcinogenesis from polymer implants: New aspects from chromosomal and transplantation studies during premalignancy.
J.Nat.Cancer Inst., 39, 663, 1967

(72) VOGT, M.
A study of the relationship between karyotype and phenotype in cloned lines of strain HeLa
Genetics, 44, 1257, 1959

(73) KOLLER, P.C.
Chromosomes: The genetic component of the tumour cells.
in: The Biology of Cancer, edited by E.J. Ambrose and F.J.C. Roe
D. van Nostrand Company Ltd., London, 1966

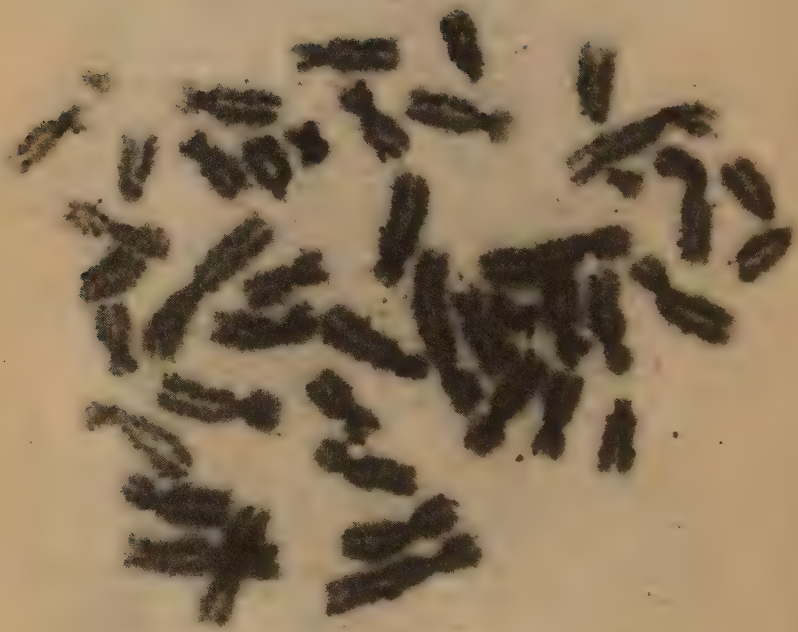
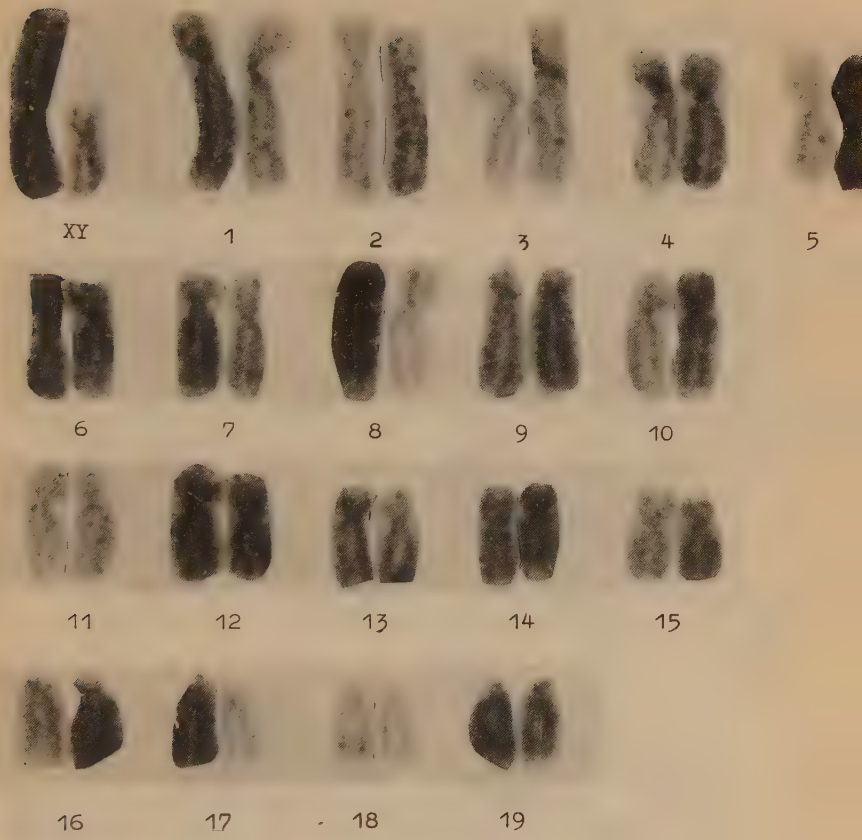


Abb. 1 Normaler Karyotyp des syrischen Goldhamsters



NORMALER KARYOTYP
HAMSTEREMBRYONALZELLEN

nach 4 Wochen Kultur
in vitro

CHROMOSOMENZAHL 44

KARYOTYP ZU ABBILDUNG 1

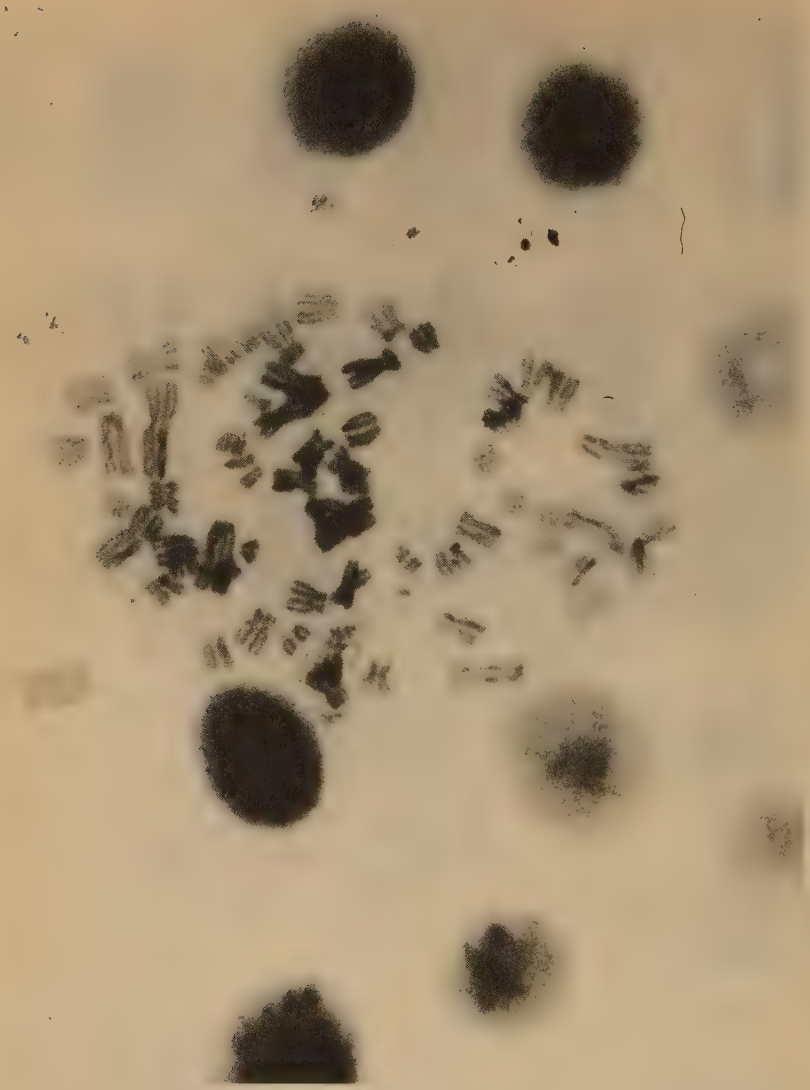


Abb. 2: Endoreduplikation

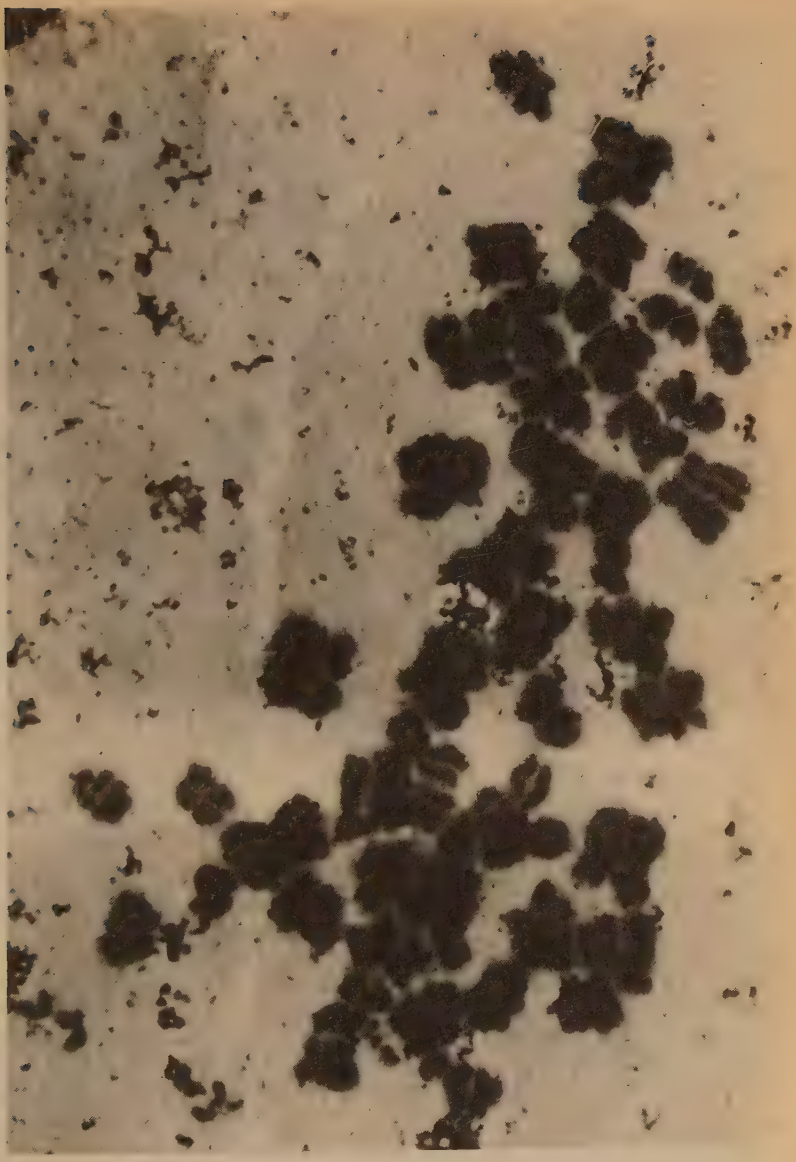


Abb. 3 Endoreduplikation

Abb. 4 Endoreduplikation

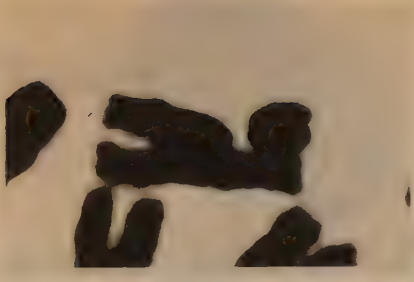


Abb. 5 Endoreduplikation mit Deletion

Abb. 6 Endoreduplikation mit Deletion

Abb. 7 Endoreduplikation mit Translokation

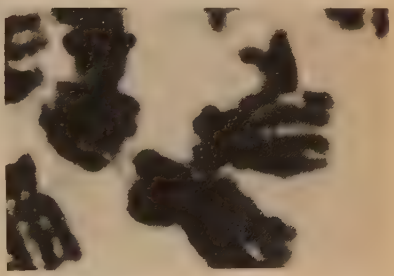


Abb. 8 Endoreduplikation mit Translokation

Abb. 9 Endoreduplikation mit Translokation

Abb.10 Endoreduplikation mit Translokation

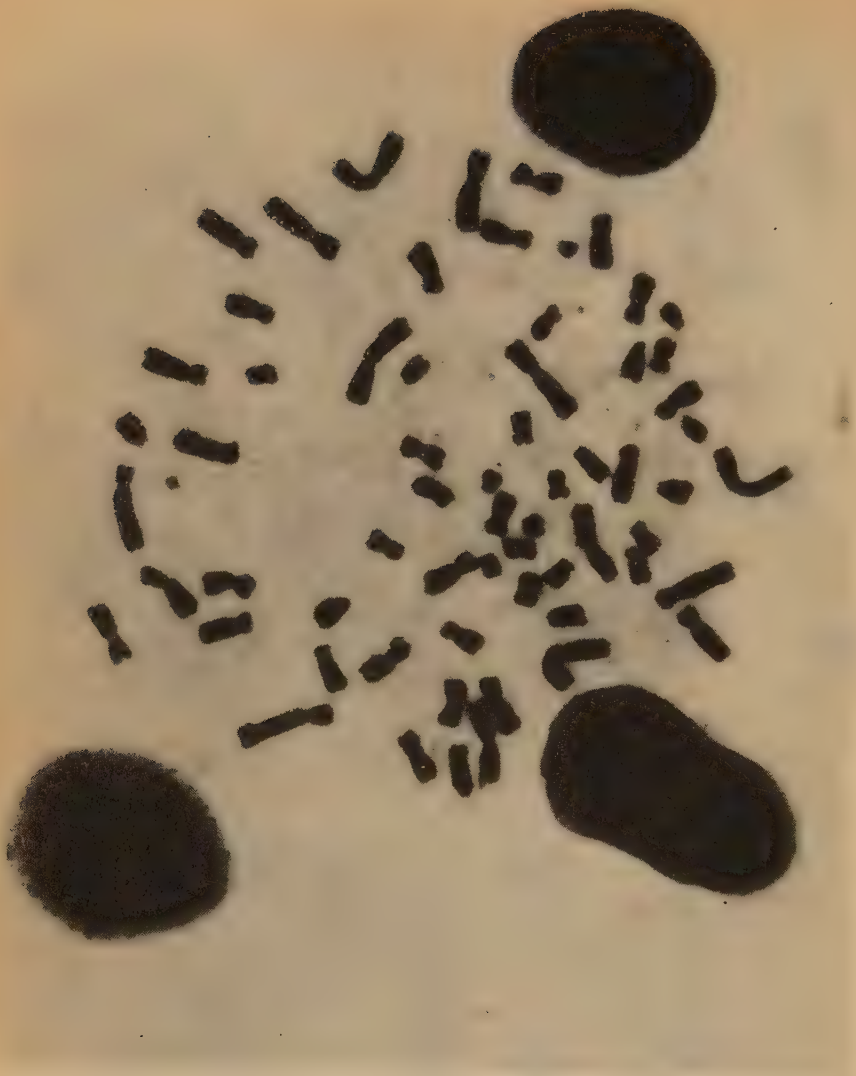
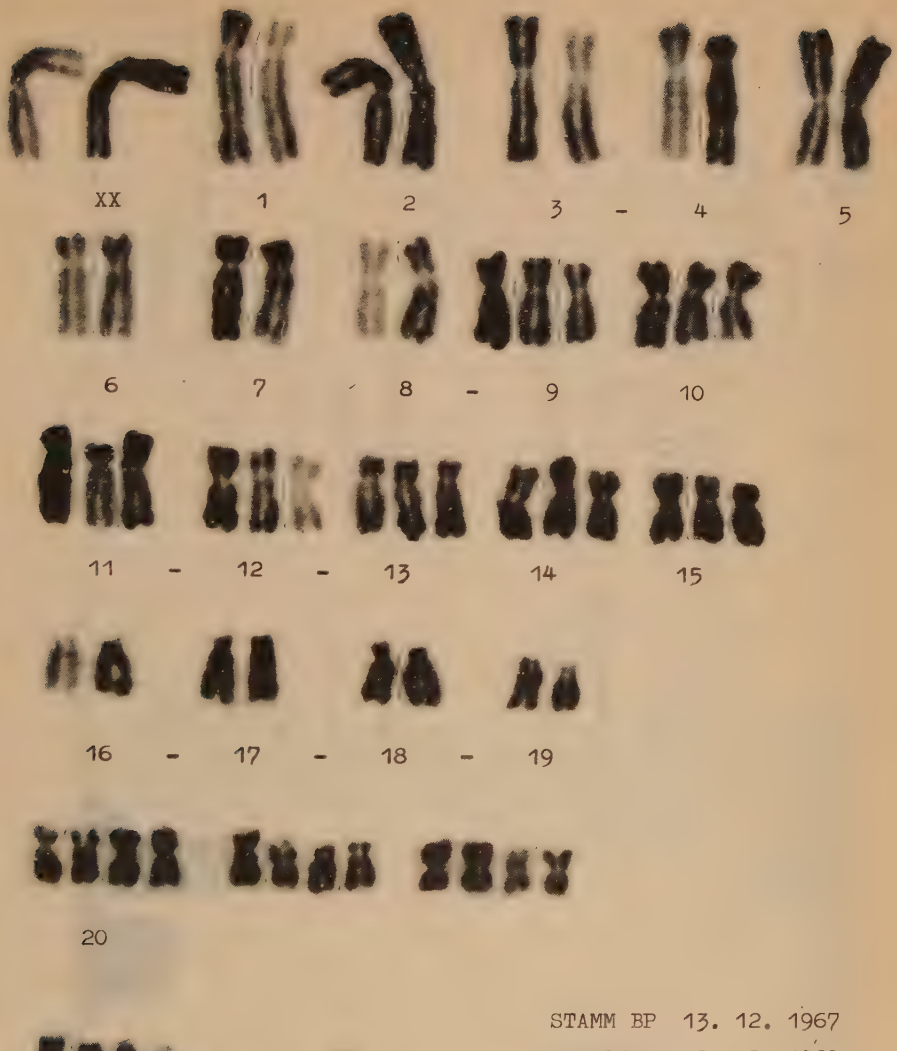


Abb. 11 Karyotyp von Stamm BP 13. 12. 1967
untersucht am 2. 3. 1969



STAMM BP 13. 12. 1967
KARYOTYP 2. 3. 1969

CHROMOSOMENZAHL 64

KARYOTYP ZU ABBILDUNG 11

TAFEL 1

30

Zahl

der

Metaphasen

20

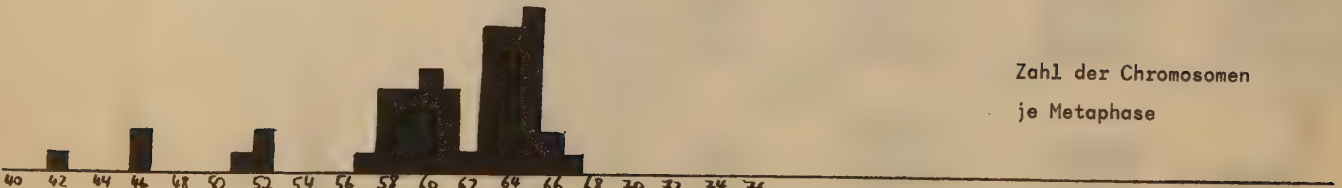
10

CHROMOSOMENVERTEILUNG

STAMM B P 13.12.1967

untersucht am 21. 3.1968

ausgewertet 50 Metaphasen



Zahl der Chromosomen

je Metaphase

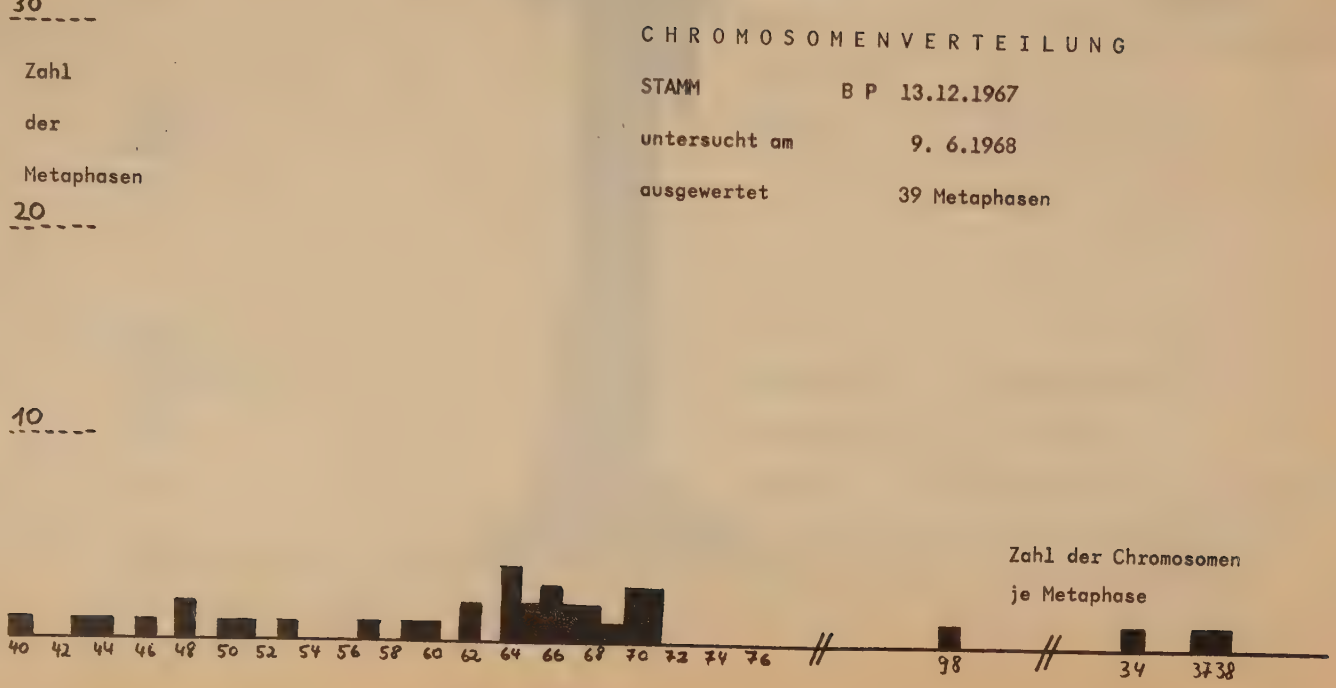
TAFEL 2

CHROMOSOMENVERTEILUNG

STAMM B P 13.12.1967

untersucht am 9. 6.1968

ausgewertet 39 Metaphasen



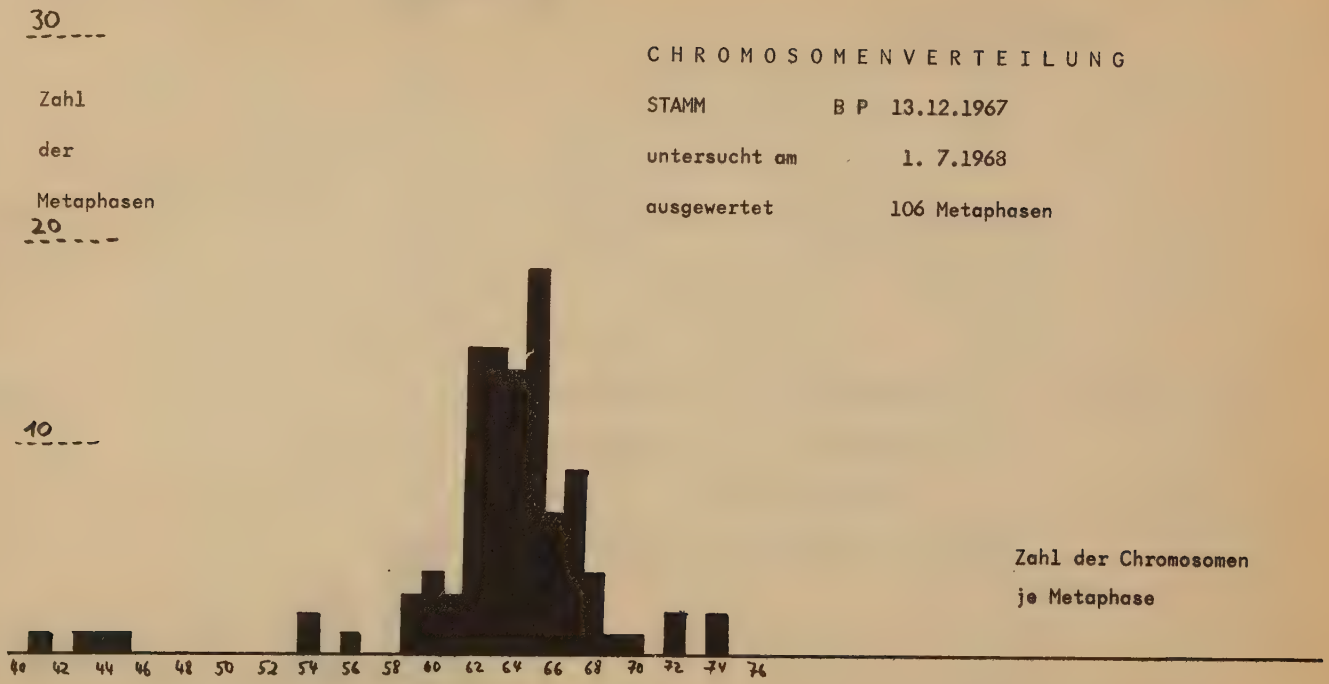
TAFEL 3

CHROMOSOMENVERTEILUNG

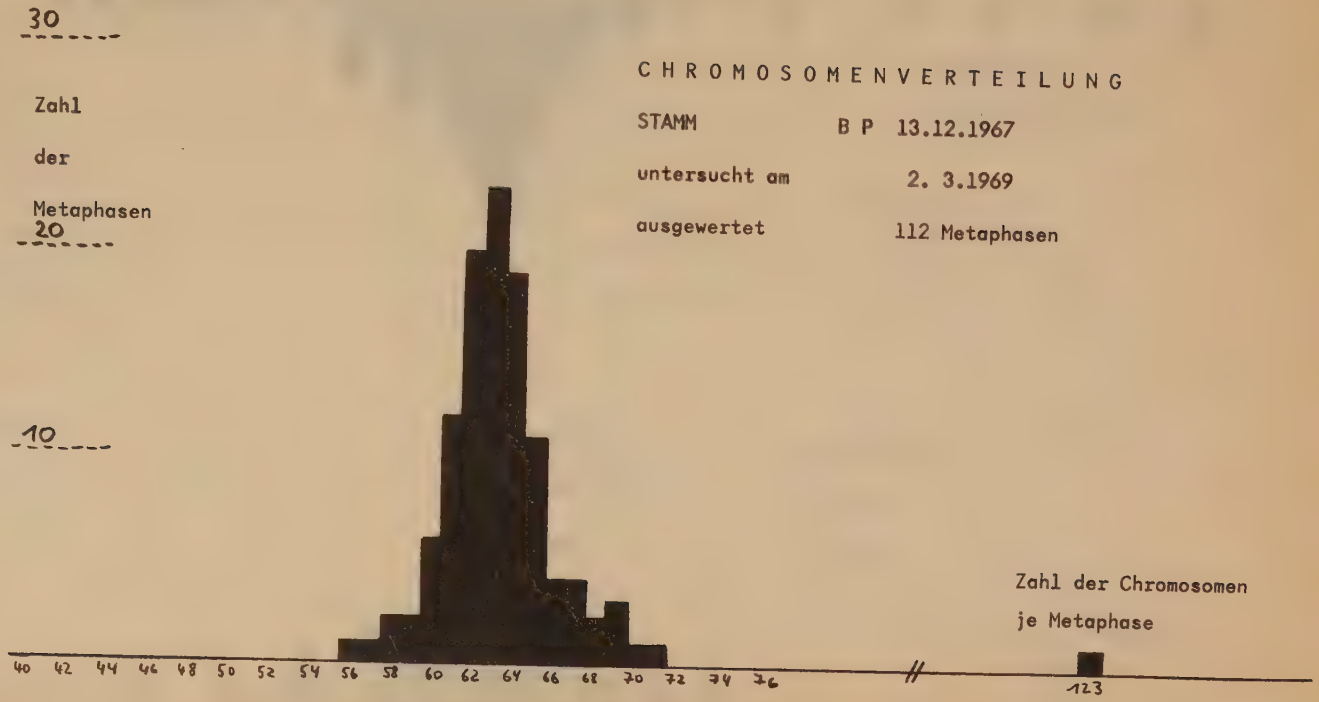
STAMM B P 13.12.1967

untersucht am 1. 7.1968

ausgewertet 106 Metaphasen



TAFEL 4


30
Zahl
der
Metaphasen
20
10
CHROMOSOMENVERTEILUNG
STAMM B P 13.12.1967
untersucht am 2. 3.1969
ausgewertet 112 Metaphasen
40 42 44 46 48 50 52 54 56 58 60 62 64 66 68 70 72 74 76
123
Zahl der Chromosomen
je Metaphase

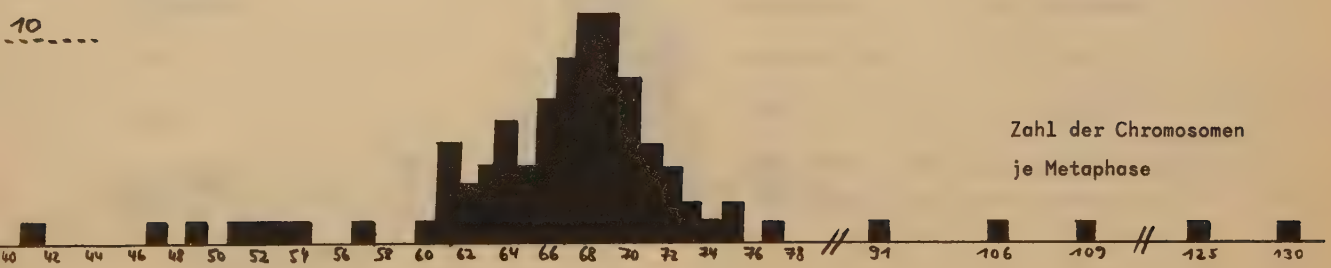
TAFEL 5

CHROMOSOMENVERTEILUNG

STAMM H E 21.2.1968

untersucht am 8.5.1968

ausgewertet 97 Metaphasen



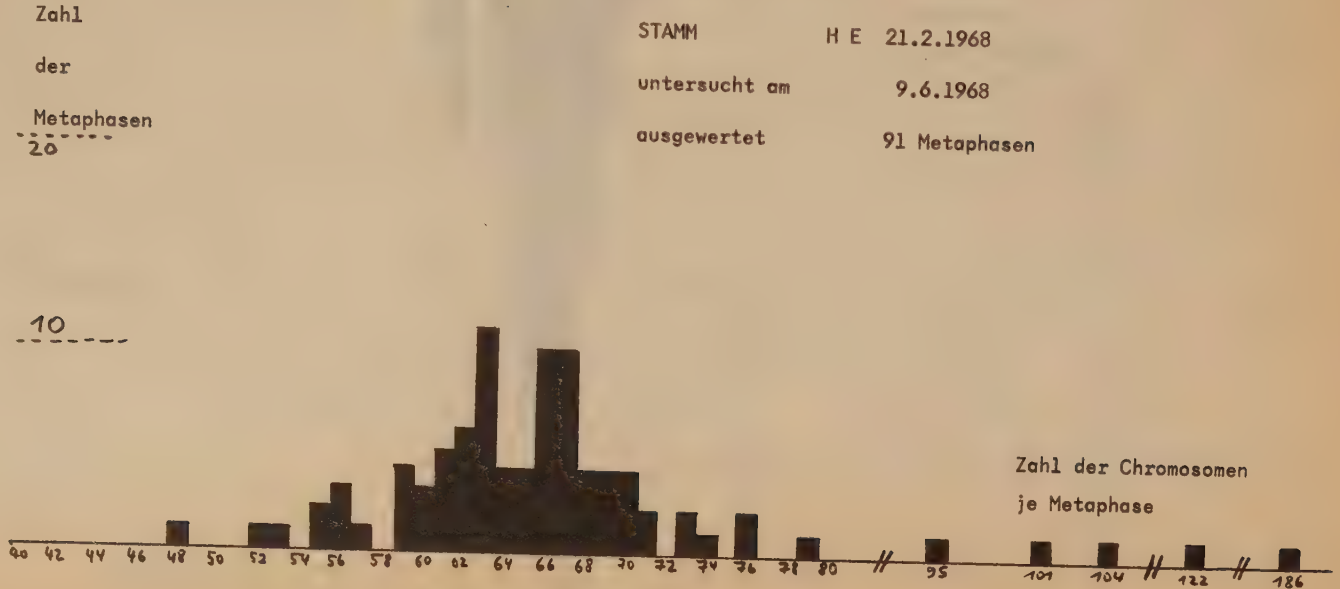
TAFEL 6

CHROMOSOMENVERTEILUNG

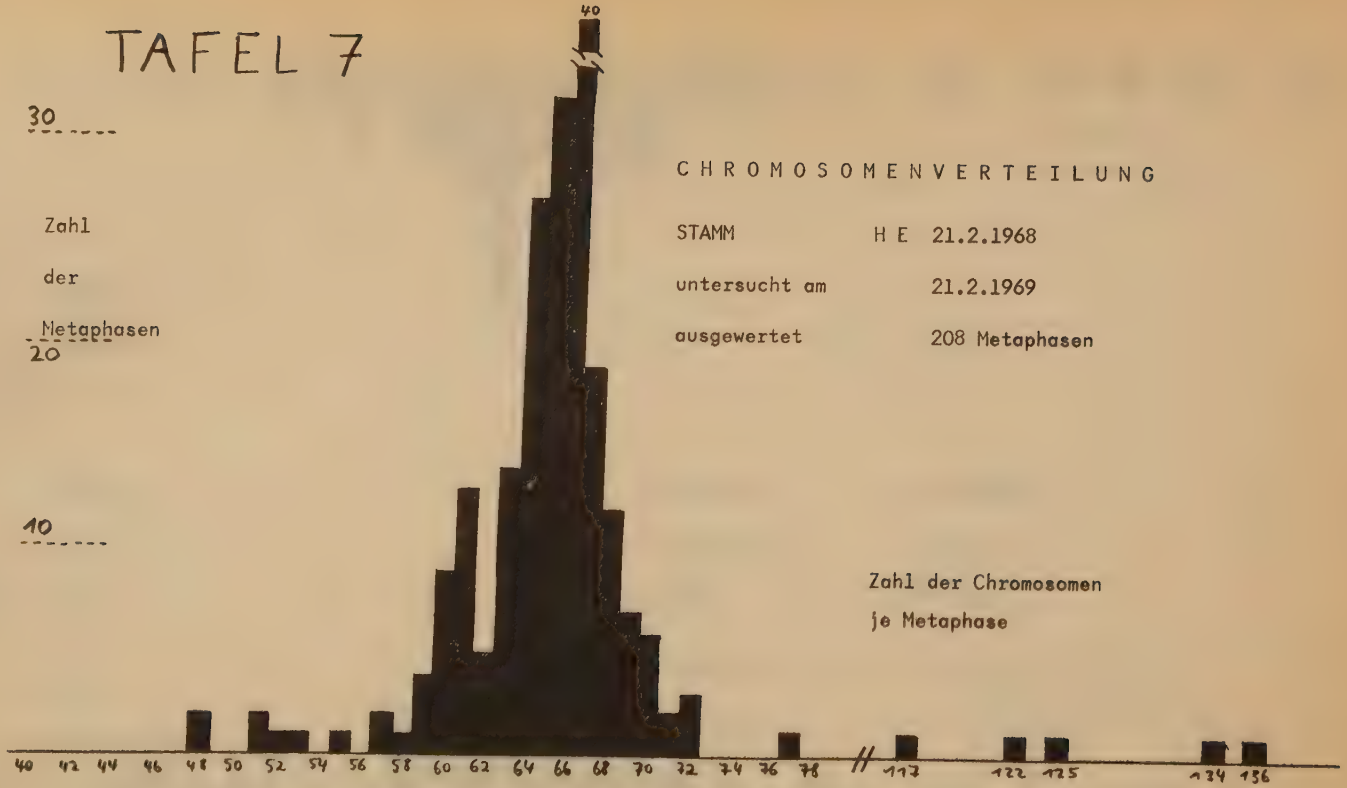
STAMM H E 21.2.1968

untersucht am 9.6.1968

ausgewertet 91 Metaphasen



TAFEL 7



CHROMOSOMENVERTEILUNG

STAMM	H E
untersucht am	21.2.1968
ausgewertet	21.2.1969
	208 Metaphasen

Lebenslauf

21. 2. 1944	in Zittau geboren als Sohn des Regierungsdirektors Dr. Werner Horowski und seiner Ehefrau Mechthild, geb. Löffler
1950-1954	Besuch der Volksschule in Tübingen
1954-1963	Besuch des humanistischen Uhlandgymnasiums in Tübingen
1963	Studium der Medizin in Tübingen
1965	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
1965-1966	Studium in Heidelberg
1966	Studium in Berlin
Sept. 1966 - April 1967	Studium in Paris und Arbeit im Hôpital St. Louis und Institut für Leukämieforschung bei Jean Bernard
1967-1969	Studium in Tübingen und Arbeit als Doktorand am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Biophysikalische Abteilung, bei Prof. Dr. Friedrich-Freksa
13. 2. 1969	Studium der Medizin mit dem Staatsexamen abgeschlossen
30. 3. 1969	Experimenteller Teil der Doktorarbeit "Cytogenetische Untersuchungen an Hamsterembryozellen nach Transformation zu permanentem Wachstum" abgeschlossen.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33